

**Zum Mechanismus des Transports von
Prepromelittin der Honigbiene
in das endoplasmatische Retikulum**

Günter Müller

Disbui. München

1987



Zum Mechanismus des Transports von
Prepromelittin der Honigbiene
in das endoplasmatische Retikulum

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günter Müller
aus Peißenberg

München

November 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bandlow

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf

Sonderberichterstatter: Priv. Doz. Dr. R. Zimmermann

Tag der mündlichen Prüfung: ~~21~~.12.1987

16

Die Naturforschung hat keinen *wirklichen* Fortschritt gebracht?

- Wenn Einer kratzt, wo es ihn juckt, muß ein Fortschritt zu sehen sein? Ist es sonst kein echtes Kratzen oder kein echtes Jucken? Und kann diese Reaktion auf die Reizung lange Zeit so weitergehen, ehe ein Mittel gegen das Jucken gefunden wird?

- Das Schicksal steht im Gegensatz zum Naturgesetz. Das Naturgesetz will man ergründen, und verwenden, das Schicksal nicht.

Ludwig Wittgenstein



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Inhaltsverzeichnis

SEITE

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Die biologische Membran	1
1.2.	Die Biogenese von biologischen Membranen und Zellorganellen	1
1.3.	Zwei verschiedene Mechanismen des Transports von Proteinen in und über biologische Membranen	3
1.4.	Mechanismus des Transports von Proteinen in das endoplasmatische Retikulum	5
1.4.1.	Das Signalpeptid von Vorstufenproteinen	5
1.4.2.	Die Konformation von Vorstufenproteinen	6
1.5.	Kleine Vorstufenproteine und die Analyse des Proteintransports über die Membran des endoplasmatischen Retikulums	9
1.6.	Der Transport von Prepromelittin der Honigbiene in das endoplasmatische Retikulum	11
1.7.	Zielsetzung dieser Arbeit	14
2.	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1.	Material	15
2.1.1.	Chemikalien	15
2.1.2.	Geräte	16
2.2.	Methoden	18
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1.1.	Aufbewahrung von transformierten E.coli-Zellen als Glycerinstammkulturen	18
2.2.1.2.	Isolierung von Plasmiden	18
2.2.1.2.1.	Präparationen im großen Maßstab	18
2.2.1.2.2.	Präparationen im kleinen Maßstab	20
2.2.1.3.	Enzymatische Modifikationen von Desoxyribonukleinsäuren	21
2.2.1.3.1.	Verdau von DNS mit Restriktionsendonukleasen	21

2.2.1.3.2.	Verdau von DNS mit unspezifischen Nukleasen	22
2.2.1.3.3.	Synthese von DNS	24
2.2.1.3.4.	Phosphorylierung von Oligonukleotiden	28
2.2.1.3.5.	Dephosphorylierung von DNS	29
2.2.1.3.6.	Ligation von DNS	29
2.2.1.4.	Gelelektrophorese von DNS	31
2.2.1.4.1.	Agarosegelelektrophorese	31
2.2.1.4.2.	Polyacrylamidgelelektrophorese	32
2.2.1.5.	Isolierung von DNS aus Agarose- oder Polyacrylamidgelen	34
2.2.1.5.1.	Transfer von Restriktionsfragmenten auf DEAE-Membran	34
2.2.1.5.2.	Elektroelution von Restriktionsfragmenten	35
2.2.1.5.3.	Elution von Oligonukleotiden	35
2.2.1.6.	Reinigung von DNS	36
2.2.1.6.1.	Alkalischer Saccharosegradient	36
2.2.1.6.2.	Phenolextraktion	37
2.2.1.6.3.	Extraktion mit Äther	37
2.2.1.6.4.	Extraktion mit Butanol	38
2.2.1.6.5.	Chromatographie durch Sephadex G-50	38
2.2.1.6.6.	Fällung mit Ethanol	38
2.2.1.7.	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS	39
2.2.2.	Synthese von Vorstufenproteinen <u>in vitro</u>	40
2.2.2.1.	Transkription mit SP6 RNS-Polymerase	40
2.2.2.2.	Translation im zellfreien System	41
2.2.2.2.1.	Herstellung des Kaninchen-Retikulozytenlysats	41
2.2.2.2.2.	Synthese von Proteinen im Kaninchen-Retikulozytenlysats	43
2.2.2.2.3.	Präparation von "vorstufenfreiem" Kaninchen-Retikulozytenlysats	45
2.2.3.	Transport von Vorstufenproteinen in Mikrosomen aus Hundepankreas	45

2.2.3.1.	Isolierung von Mikrosomen aus Hundepankreas	45
2.2.3.2.	Behandlung von Mikrosomen mit Trypsin	47
2.2.3.3.	Posttranslati onaler Transport von Proteinen in Mikrosomen	48
2.2.3.4.	Reisolierung von Mikrosomen durch Saccharosegradientenzentrifugation	48
2.2.3.4.1.	Herstellung des Saccharosegradienten	48
2.2.3.4.2.	Fraktionierung des Saccharosegradienten	48
2.2.3.5.	Behandlung von Mikrosomen mit Proteinase K	49
2.2.4.	Analytische Techniken	49
2.2.4.1.	HPLC-Analyse	49
2.2.4.2.	Fraktionierung von Proteingemischen mit Butanol	50
2.2.4.3.	Fällung von Proteingemischen mit Ammoniumsulfat	51
2.2.4.4.	Fällung von Proteinen mit Antikörpern	51
2.2.4.5.	Diskontinuierliche SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese	52
2.2.4.5.1.	Herstellung der Gele	52
2.2.4.5.2.	Präparation der Proben und Durchführung der Elektrophorese	54
2.2.4.5.3.	Fluorographie	54
2.2.4.5.4.	Densitometrie	55
3.	ERGEBNISSE	56
3.1.	Verhalten von Prepromelittin der Honigbiene und Dihydrofolatreduktase der Maus in Gegenwart von Hundepankreas-Mikrosomen	56
3.2.	Strukturelle Voraussetzungen für die SRP/Dockingprotein-Unabhängigkeit des Transports von Prepromelittin	61
3.2.1.	Konstruktion von Hybridproteinen zwischen Prepromelittin der Honigbiene und Dihydrofolatreduktase der Maus	62
3.2.2.	Einfluß der Erhöhung des Molekulargewichts auf die SRP/Dockingprotein-Unabhängigkeit des Transports von Prepromelittin	69

3.2.3.	Die Rolle des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine im SRP/Dockingprotein-unabhängigen Transport	73
3.2.3.1.	Bedeutung der Größe des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine für den Transport in Mikrosomen	73
3.2.3.2.	Die Bedeutung der Aminosäuresequenz des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine für den Transport in Mikrosomen	76
3.2.3.2.1.	Auswirkung der Häufung geladener Aminosäuren innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine auf den Transport in Mikrosomen	77
3.2.3.2.2.	Auswirkung von einzelnen geladenen Aminosäuren innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine auf den Transport in Mikrosomen	80
3.2.3.2.3.	Auswirkung einer hydrophoben Domäne innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine auf den Transport in Mikrosomen	84
3.2.4.	Hypothetische, für den Transport in Mikrosomen erforderliche Konformation von Prepromelittin und von Prepromelittin abgeleiteten Vorstufenproteinen	86
3.3.	Bedeutung der Konformation und des Energiebedarfs kleiner Vorstufenproteine für den Transport in Mikrosomen	88
3.3.1.	Posttranslati onaler Transport von kleinen Vorstufenproteinen in Mikrosomen aus Hundepankreas	89
3.3.2.	Konstruktion von kleinen Vorstufenproteinen mit zwei Cysteinresten im reifen Teil	91
3.3.3.	Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des reifen Teils von kleinen Vorstufenproteinen	94
3.3.3.1.	Nachweis der Disulfidbrücken durch HPLC-Analyse der Vorstufenproteine	94
3.3.3.2.	Nachweis der Disulfidbrücken durch Gelelektrophorese der Vorstufenproteine	98
3.3.4.	Auswirkungen von Disulfidbrücken auf den Gesamtvorgang des Transports kleiner Vorstufenproteine in Mikrosomen	100
3.3.4.1.	Folgen von intramolekularen Disulfidbrücken im reifen Teil kleiner Vorstufenproteine auf den Transport in Mikrosomen	101
3.3.4.2.	Folgen von intermolekularen Disulfidbrücken auf den Transport kleiner Vorstufenproteine in Mikrosomen	104

3.3.4.2.1.	Disulfidbrücken zwischen freiem Cystein und Cystein enthaltenden kleinen Vorstufenproteinen	104
3.3.4.2.2.	Disulfidbrücken zwischen Mercaptoethanol und Cystein enthaltenden kleinen Vorstufenproteinen	106
3.3.4.2.3.	Disulfidbrücken zwischen einem oligomeren Peptid und Cystein enthaltenden kleinen Vorstufenproteinen	110
3.3.4.2.4.	Disulfidbrücken zwischen Glutathion und Cystein enthaltenden kleinen Vorstufenproteinen	114
3.3.5.	Notwendigkeit von Nukleosidtriphosphaten für den Gesamtvorgang des Transports von kleinen Vorstufenproteinen	118
3.3.5.1.	Unterschiedlicher Bedarf an Nukleosidtriphosphaten für den Transport kleiner Vorstufenproteine mit unterschiedlichen reifen Teilen	118
3.3.5.2.	Einfluß von nicht-hydrolyisierbaren ATP-Analoga auf den Transport von kleinen Vorstufenproteinen in Mikrosomen	121
3.3.6.	Einfluß von Disulfidbrücken im reifen Teil von Vorstufenproteinen und von Energie auf einzelne Schritte des Transports in Mikrosomen	123
3.3.6.1.	Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit Mikrosomen bei niedriger Temperatur	123
3.3.6.2.	Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit Mikrosomen nach Oxidation oder Entfernung von Nukleosidtriphosphaten	127
3.3.6.3.	Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit Mikrosomen bei niedriger Temperatur und nachfolgende Insertion in und Transfer über die mikrosomale Membran bei erhöhter Temperatur	130
3.3.6.4.	Bedeutung von Nukleosidtriphosphaten für die Assoziation kleiner Vorstufenproteine mit und Insertion in die mikrosomale Membran	134
3.3.6.5.	Bedeutung des Retikulozytenlysats für die Insertion von kleinen Vorstufenproteinen in die mikrosomale Membran	137
3.3.6.6.	Bedeutung von Nukleosidtriphosphaten für die Prozessierung kleiner Vorstufenproteine durch Leaderpeptidase aus E.coli	140
3.3.6.7.	Einfluß von Disulfidbrücken innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine auf die Assoziation mit und Insertion in die mikrosomale Membran	143



3.3.6.8.	Einfluß von Disulfidbrücken auf die Prozessierung kleiner Vorstufenproteine durch Leaderpeptidase aus E.coli	145
3.3.7.	Bedeutung von Nukleosidtriphosphaten für die Konformation kleiner Vorstufenproteine	149
3.3.7.1.	Einfluß von Nukleosidtriphosphaten auf die Proteasesensitivität kleiner Vorstufenproteine	150
3.3.7.2.	Einfluß von Disulfidbrücken auf die NTP-abhängige Proteasesensitivität kleiner Vorstufenproteine	153
3.4.	Untersuchungen zur Konformation von SRP/Dockingprotein-abhängigen Vorstufenproteinen während des Transports in Mikrosomen	157
3.4.1.	Vollständig synthetisierte große Vorstufenproteine und Transport in Mikrosomen	158
3.4.2.	Einfluß eines Liganden auf den Transport von großen Vorstufenproteinen in Mikrosomen	161
3.4.2.1.	Bindung von Methotrexat an Hybridproteine zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase	161
3.4.2.2.	Transport von Hybridproteinen zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase in Mikrosomen in Gegenwart von Methotrexat	163
3.4.3.	Transport von Ribosomen assoziierten großen Vorstufenproteinen in Mikrosomen	167
4.	DISKUSSION	171
4.1.	Zum Mechanismus der Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums	172
4.2.	Zum Mechanismus der Insertion von kleinen Vorstufenproteinen in die Membran des endoplasmatischen Retikulums	180
4.3.	Zum Mechanismus des Transfers der reifen Form kleiner Vorstufenproteine über die Membran des endoplasmatischen Retikulums	187
4.4.	Hypothetischer Mechanismus zum Transport kleiner Vorstufenproteine in das endoplasmatische Retikulum	189
4.5.	Zum Mechanismus des Transports großer Vorstufenproteine in das endoplasmatische Retikulum	193

5.	ZUSAMMENFASSUNG	197
6.	LITERATURVERZEICHNIS	200
7.	ABKÜRZUNGEN	219
8.	DANKSAGUNG	221
9.	LEBENS LAUF	222

1. EINLEITUNG

1.1. Die biologische Membran

Die Entstehung der biologischen Membran war ein entscheidender Schritt in der Entwicklung frühester Formen des Lebens. Ohne sie ist zelluläres Leben nicht möglich. Die Plasmamembran, die jede Zelle umgibt, bestimmt die Identität der Zelle und hält die Unterschiede zwischen ihr und der Umgebung aufrecht. Sie ist eine hoch selektive Permeabilitätsbarriere und kontrolliert den Informationsfluß zwischen den Zellen und ihrer Umgebung. Damit spielt sie eine wichtige Rolle in der biologischen Kommunikation. Darüberhinaus besitzen eukaryontische Zellen im Gegensatz zu prokaryontischen Zellen intrazelluläre Membransysteme. Diese bilden die Grenzen von Organellen (Mitochondrien, Chloroplasten, Lysosomen, Vakuolen, Peroxisomen, endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat) und sind auf bestimmte physiologische Leistungen (z.B. Energiegewinnung, intrazellulärer Verdau, Entgiftung, posttranslationale Modifikationen und Sekretion) spezialisiert. Im Laufe der Evolution vielzelliger Organismen war die funktionelle Spezialisierung von einzelnen Zellen eng mit der Entstehung dieser Kompartimente verbunden.

1.2. Die Biogenese von biologischen Membranen und Zellorganellen

Membranen können im Gegensatz zu anderen komplexen Strukturen (z.B. Bakteriophagen, Ribosomen, multimeren Enzymkomplexen, Cytoskelett) nicht durch "Self Assembly" aus ihren einzelnen Komponenten, d.h. Lipiden und Proteinen, spontan aufgebaut werden. Vielmehr entstehen biologische Membranen immer nur durch Einfügen von neuen Komponenten in bereits existierende Strukturen (Bretscher, 1976; Morre et al., 1979). Dieses Prinzip (omne

membranam e membrano) muß auch für die Entstehung von Zellen selbst gelten (omnis cellula e cellula). Bei jeder Zellteilung werden die Membranen und die von ihnen gebildeten Kompartimente gewissermaßen "vererbt", d.h. jede Tochterzelle erhält neben der Plasmamembran im Falle der Eucyte zusätzlich eine vollständige "Grundausrüstung" an Membransystemen. Die Information zum Aufbau, zur Erhaltung und zum Wachstum einer Membran oder eines Organells liegt also in diesen Strukturen selbst. Die DNS liefert nur die Information zur Synthese der einzelnen Bausteine. Der Mechanismus zur Verwirklichung des Informationsgehalts der Membran oder des Organells muß die funktionelle, räumliche und zeitliche Kontinuität während der Biogenese von Membranen und Zellorganellen gewährleisten (Palade, 1975). Die Inkorporation von Proteinen in die Membran bzw. der Transport von Proteinen über die Membran in das Lumen der Organellen stellt hierbei ein besonderes Problem dar. Da die Proteinbiosynthese, ausgenommen die Synthese einiger mitochondrialer Proteine (Schatz und Mason, 1974) im Cytoplasma stattfindet, müssen Proteine, die nicht im Cytoplasma verbleiben sollen, in Membranen oder über Membranen hinweg an den Ort ihrer Funktion gelangen.

Die Phospholipiddoppelschicht der Membran wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten (Singer und Nicholson, 1972; Tanford, 1978) und erschwert oder verhindert den Durchtritt von Molekülen. Bereits niedermolekulare polare Verbindungen, wie Zucker oder Aminosäuren, weisen keine passive Diffusion mehr auf und benötigen deshalb für die Überquerung von biologischen Membranen spezifische, aus Membranproteinen bestehende Transportsysteme (Singer, 1977; Lodish und Rothman, 1979). Auch für die Inkorporation von Proteinen in oder ihren Transport über den apolaren Kern der Membranen müssen daher spezielle Mechanismen

existieren.

1.3. Zwei verschiedene Mechanismen des Transports von Proteinen in und über biologische Membranen

Im Verlauf der Evolution scheinen sich zwei verschiedene Mechanismen für den Transport von Proteinen in bzw. über die Membranen von Organellen entwickelt zu haben, die, nach älterer Auffassung, unterschiedlichen, schwer miteinander zu vereinbarenden Gesetzmäßigkeiten gehorchen (Blobel, 1980). Mitochondrien (Schatz, 1979; Neupert und Schatz, 1981), Chloroplasten (Chua und Schmidt, 1979), Peroxisomen (Goldman und Blobel, 1978) und Glyoxysomen (Zimmermann und Neupert, 1980b) sind Organellen mit transportkompetenten Membranen, die dem posttranslationalen Mechanismus unterliegen. Sie sind in der Lage, sowohl in vivo als auch in vitro an freien cytoplasmatischen Ribosomen synthetisierte Proteine nach Beendigung der Synthese aus dem Cytosol aufzunehmen und in die entsprechende funktionelle Position innerhalb des Organells (Membran oder lösliches Kompartiment) zu bringen. Im Falle der Mitochondrien und wohl auch der anderen Organellen unterscheiden sich dabei die zu transportierenden und im Cytoplasma gelösten Proteine in ihrer Konformation von den funktionalen, im Organell assemblierten (Schleyer und Neupert, 1984). Diese Konformationsänderung während des Transports wird entweder durch die Abspaltung einer aminoterminalen Präsequenz (Macchechini et al., 1979), Anheftung einer prosthetischen Gruppe (Hennig und Neupert, 1981 und 1983) oder die Interaktion mit Lipiden der Membran (Freitag et al., 1982) bzw. mit anderen Proteinen (Klingenberg, 1978; Dowhan et al., 1985) erreicht. Die Vorläufer verschiedener mitochondrialer Proteine weisen für den Import in Mitochondrien eine unterschiedliche Abhängigkeit vom

Membranpotential (Zimmermann und Neupert, 1980a; Zimmermann et al., 1981; Schleyer et al., 1982) und von Nukleosidtriphosphaten (Pfanner und Neupert, 1986; Pfanner et al., 1987b) auf. Sie werden von proteasesensitiven Rezeptoren der äußeren mitochondrialen Membran spezifisch erkannt (Hennig et al., 1983; Riezman et al., 1983; Zwizinski et al., 1984; Pfaller und Neupert, 1987). Interessanterweise scheint der Transport von Proteinen in das Periplasma und in die äußere Membran von Bakterien in vivo (Date et al., 1980; Ito et al., 1980; Goodman et al., 1981; Randall, 1983; Randall und Hardy, 1986) wie in vitro (Müller und Blobel, 1984; Chen und Tai, 1985) dem posttranslationalen Mechanismus zu unterliegen.

Die übrigen Organellen und die Plasmamembran der eukaryontischen Zelle erhalten ihre Membranproteine oder ihre luminalen Proteine durch Fusion mit Membranvesikeln. Diese schnüren sich ursprünglich vom endoplasmatischen Retikulum ab und durchlaufen dann in einer Folge von Fusions- und Abschnürungsvorgängen die einzelnen Stationen des sog. "secretory pathway" (Palade, 1983), nämlich Golgi-Apparat, sekretorische Vesikel und Plasmamembran bzw. Golgi-Apparat und Lysosomen. Während dieser Passage können die Proteine verschiedene posttranslationale Modifikationen erfahren, wie Einführung von Disulfidbrücken im endoplasmatischen Retikulum (Bergman und Kuehl, 1979; Creighton et al., 1980; Roth und Koshland, 1981; Mills et al., 1983; Lambert und Freedman, 1985), Anheftung von Kohlenhydraten im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat (Olden et al., 1982; Roth, 1984; Kornfeld und Kornfeld, 1985) und proteolytische Prozessierung in sekretorischen Vesikeln (Uy und Wold, 1977; Steiner et al., 1980). Unklar bleibt, auf welche Weise die verschiedenen Proteine nach Erreichen des endoplasmatischen Retikulums zu ihrem jeweiligen

Bestimmungsort dirigiert werden. Allen Proteinen, die über diesen vesikulären Transport in die Membran bzw. in das Lumen von Organellen, in die Plasmamembran oder in den extrazellulären Raum gelangen, ist gemeinsam, daß die Membran des endoplasmatischen Retikulums die einzige zelluläre Barriere darstellt, in die sie inkorporiert oder durch die sie hindurch transportiert werden müssen. Das endoplasmatische Retikulum besitzt eine transportkompetente Membran, die dem cotranslationalen Transportmechanismus zu unterliegen schien.

1.4. Mechanismus des Transports von Proteinen in das endoplasmatische Retikulum

1.4.1. Das Signalpeptid von Vorstufenproteinen

Proteine, die zur Überquerung der Membran des endoplasmatischen Retikulums oder zur Inkorporation in diese befähigt sind, besitzen abspaltbare (Meyer et al., 1982) oder nicht spaltbare (Rottier et al., 1985; Spiess und Lodish, 1986; Zerial et al., 1986) Aminosäuresequenzen. Diese sog. Signalsequenzen befinden sich entweder am Aminoterminus (Milstein et al., 1972) oder (nicht spaltbar) an einer internen Position (Palmiter et al., 1977 und 1978) der Polypeptidkette. Spaltbare Signalsequenzen enthalten eine zentrale, stark hydrophobe Region (von Heijne, 1981) und weisen positiv geladene Aminosäuren nur an ihrem Aminoende auf (Perlman und Halvorson, 1983). In der Nähe der Spaltstelle befinden sich häufig einige Aminosäuren mit kleiner Seitenkette (von Heijne, 1983). Zwischen verschiedenen Signalsequenzen lassen sich jedoch keine ausgeprägten Sequenzhomologien feststellen (Duffaud et al., 1985; von Heijne, 1986). Die Bedeutung der Signalsequenz für den Transport von Proteinen in

das endoplasmatische Retikulum wird aus Fusionen zwischen Signalpeptiden von sekretorischen Proteinen mit cytoplasmatischen Proteinen ersichtlich. Sowohl in vivo (Bitter et al., 1984) als auch in vitro (Lingappa et al., 1984) gelangen die Fusionsproteine in das endoplasmatische Retikulum. Die Abspaltung des Signalpeptids (Prozessierung) erfolgt während des Transports des Vorstufenproteins über die Membran des endoplasmatischen Retikulums (Rothman and Lenhard, 1977b) durch die wahrscheinlich membrangebundene Signalpeptidase. Die Aktivität dieses Enzyms ist gegen das Lumen des endoplasmatischen Retikulums gerichtet (Jackson und Blobel, 1977; Mollay et al., 1982; Evans et al., 1986).

Anhand der Prozessierung lassen sich drei Schritte im Transportvorgang definieren (Hortsch und Meyer, 1984; Wickner und Lodish, 1985): i) Assoziation des Vorstufenproteins mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums. ii) Insertion des Vorstufenproteins in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (Prozessierung). Dabei hat ein großer Teil des reifen Proteins die Membran noch nicht überquert. iii) Transfer der reifen Form über die Membran des endoplasmatischen Retikulums (Sequestrierung). Die meisten Ergebnisse zur Klärung des Mechanismus' des Transportvorgangs im allgemeinen und zum Ablauf der einzelnen Schritte im besondern lieferten Untersuchungen in in vitro Systemen. Diese enthalten in Kaninchen-Retikulozytenlysaten oder Weizenkeimlysaten synthetisierte Vorstufenproteine und Mikrosomen. Letztere Membranvesikel leiten sich vom endoplasmatischen Retikulum ab und werden zumeist aus Hundepankreaszellen gewonnen (Blobel und Dobberstein, 1975a und b).

1.4.2. Die Konformation von Vorstufenproteinen

Für die Aufklärung des Transportmechanismus' von Proteinen über die Membran des endoplasmatischen Retikulums ist die Kenntnis der Konformation des Vorstufenproteins und deren mögliche Änderung während des Transportvorgangs Voraussetzung. Bis heute existieren dazu verschiedene Vorstellungen: Nach der "Signalhypothese" (Blobel und Dobberstein, 1975a und b) werden Vorläufer von sekretorischen Proteinen an membrangebundenen Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und noch während der Synthese vektorieell als lineare Polypeptidkette durch die Membran transportiert. Die Proteinsynthese liefert dabei über die starre Bindung des Ribosoms an die Membran die für die Membranpassage der Proteine erforderliche Energie. Darüberhinaus verhindert die strikte Koppelung zwischen Synthese und Transport die Ausbildung einer den Transport eventuell störenden Konformation des Vorstufenproteins. Das zu transportierende Protein tritt niemals vollständig synthetisiert auf der cytoplasmatischen Seite der Membran des endoplasmatischen Retikulums auf. Die naszierende Polypeptidkette innerhalb des Ribosoms kommt niemals mit dem wäßrigen Milieu des Cytosols in Berührung. Die Membranpassage der ungefalteten Polypeptidkette selbst erfolgt dabei durch das hydrophile Innere einer von mikrosomalen Membranproteinen gebildeten Pore. Somit befindet sich das Protein vom Zeitpunkt seiner Synthese bis zu seiner endgültigen Lokalisierung auf der dem Cytoplasma abgewandten Seite der Membran in einer wäßrigen Umgebung. Nach Prozessierung durch die Signalpeptidase falten sich die reifen Proteine im Lumen des endoplasmatischen Retikulums in ihre funktionelle Konformation. Bei Membranproteinen verursacht die Hydrophobizität der "Stop Transfer Sequenz" den Abbruch des bereits eingeleiteten Transferschrittes der prozessierten Form

und ihre Verankerung in der Membran (Rothman und Lenard, 1977a und b). Nach Auflösung der Verbindung zwischen Ribosom und Membran wird der cytoplasmatische Teil des Membranproteins an freien cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert.

Die Koppelung von Proteinsynthese und Proteintransport schien durch ein cytoplasmatisches 11S Ribonukleoproteinpartikel gewährleistet zu sein. Dieses "Signal Recognition Particle" (SRP) (Walter und Blobel, 1980) besteht aus einer 7S RNS (Walter und Blobel, 1982) und sechs verschiedenen Polypeptidketten. Es tritt mit einem Proteinkomplex der mikrosomalen Membran, dem sog. Dockingprotein oder SRP-Rezeptor (Meyer und Dobberstein, 1980; Gilmore et al., 1982a und b) in Wechselwirkung. Das Dockingprotein besteht aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 30 bzw. 69kD (Tajima et al., 1986). Das ohne spaltbare Signalsequenz synthetisierte 69kD-Polypeptid ist über eine aminoterminal hydrophobe Region in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert, während seine cytoplasmatische stark geladene Domäne (59kD) die Bindungsstelle für das SRP darstellen soll (Lauffer et al., 1985). Die Bindung von SRP über seine 54kD-Untereinheit (Kurzchalia et al., 1986) an die aus dem Ribosom hervortretende Signalsequenz eines Vorstufenproteins verhindert die Elongation der naszierenden Polypeptidkette solange, bis der gesamte Komplex aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette und SRP über das Dockingprotein an die mikrosomale Membran angekoppelt ist (Meyer et al., 1982; Walter et al., 1984). Nach Dissoziation des Komplexes und Freigabe des SRPs für einen weiteren Bindungsvorgang wird die Synthese an membrangebundenen Polysomen fortgesetzt. Dieser SRP/Ribosomen-Zyklus soll die Elongation der naszierenden Polypeptidkette in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums

hinein ermöglichen, sie jedoch im Cytoplasma unterbinden.

Die Beobachtung von posttranslationalem Transport des prokaryontischen Plasmamembranproteins M13 Procoat in *E.coli* in vivo (Ito et al., 1980) und in vitro (Goodman et al., 1981), sowie in mikrosomale Vesikel (Watts et al., 1983) führte zur Aufstellung der "Membran-Trigger-Hypothese" (Wickner, 1979b). Sie wurde nachfolgend auch auf eukaryontische Membran- und sekretorische Proteine übertragen (Wickner, 1979a). Danach sind die vollständig synthetisierten Vorstufenproteine in eine mit dem wäßrigen Milieu des Cytoplasmas zu vereinbarende Konformation gefaltet. Sie erfahren durch Assoziation mit der Membran über elektrostatische Wechselwirkungen eine spontane, durch die Membran selbst induzierte Konformationsänderung. Diese ermöglicht den Proteinen die Insertion in bzw. den Transfer über die Membran (Wickner, 1983). Die Änderung der Tertiärstruktur der Polypeptidkette und nicht die Proteinsynthese liefert somit die Energie für den Transportvorgang. Die Prozessierung des Vorstufenproteins auf der anderen Seite der Membran bewirkt dabei die Irreversibilität der Konformationsänderung und damit des gesamten Transportprozesses.

Neben diesen beiden Extremauffassungen über den Mechanismus des Transports von Proteinen in und über Membranen wurden noch weitere Hypothesen formuliert, die von der "Signalhypothese" und "Membran-Trigger-Hypothese" jeweils bestimmte Aspekte übernehmen und neu kombinieren (Inouye et al., 1977 und 1982; von Heijne und Blomberg, 1979; Engelman und Steitz, 1981; von Heijne, 1985). Sie unterscheiden sich voneinander in der Bedeutung, die sie der Koppelung von Synthese und Transport, sowie der Konformation von Vorstufenproteinen und ihrer Änderung während des Transports beimessen. Dabei gelangen sie zu divergierenden Auffassungen über die am Transportvorgang beteiligten Energieformen und Kompo-

nenten, wie Rezeptoren, Ribosomen und Porenkomplexe.

1.5. Kleine Vorstufenproteine und die Analyse des Proteintransports über die Membran des endoplasmatischen Retikulums

Die Analyse des Transportmechanismus' von Proteinen in das endoplasmatische Retikulum wurde lange Zeit durch die Tatsache erschwert, daß zumindest einige der Transportschritte (Membranassoziation, Membraninsertion, Membrantransfer) nicht nach beendeter Synthese der Vorstufenproteine stattfanden. Die scheinbare Notwendigkeit der Anwesenheit von mikrosomalen Membranen während der Proteinsynthese im in vitro Translations/Transport-System, nicht gleichzusetzen mit der von der klassischen "Signalhypothese" unter dem Begriff "cotranslationaler Transport" postulierten mechanistischen Kopplung von Translation und Transport, verhinderte Erkenntnisse über einzelne, durch Intermediate charakterisierte Schritte des Transportvorgangs, deren Energiebedarf, sowie über den positiven oder negativen Einfluß von bestimmten Konformationen der zu transportierenden Proteine. Vorstufenproteine, die an bestimmten Transportschritten beteiligte Strukturen, wie beispielsweise die Signalsequenz, innerhalb der vollständig synthetisierten Polypeptidkette zu exponieren vermögen und die gleichzeitig die Ausbildung von Strukturen vermeiden, welche mit bestimmten Transportschritten nicht zu vereinbaren sind, sollten dagegen die Analyse des Transports unter posttranslationalen Bedingungen ermöglichen. Ein geringes Molekulargewicht von Vorstufenproteinen müßte diesen Kriterien entgegenkommen. Weiterhin sollte eine Größe von weniger als 80 Aminosäuren den posttranslationalen Transport von Vorstufenproteinen aufgrund der Tatsache garantieren, daß ungefähr 40 Aminosäuren der naszierenden Polypeptidkette

innerhalb einer proteasegeschützten Domäne des Ribosoms verborgen sind (Malkins und Rich, 1967; Blobel und Sabatini, 1970). Damit bleibt nicht viel Zeit übrig zwischen dem Austreten des 20-23 Aminosäuren langen Signalpeptids aus dem Ribosom für seine Assoziation mit der Membran und der Beendigung der Synthese des Vorstufenproteins. Die Synthese ist wahrscheinlich abgeschlossen, bevor Membraninsertion und -transfer erfolgen können. Da auch kleine Vorstufenproteine typische Signalsequenzen besitzen und von der Signalpeptidase prozessiert werden, bestehen sicherlich Gemeinsamkeiten in wenigstens einigen Schritten ihres Transports in das endoplasmatische Retikulum mit dem größerer Vorstufenproteine.

1.6. Der Transport von Prepromelittin der Honigbiene in das endoplasmatische Retikulum

Aus diesen Gründen wurde für die folgenden Untersuchungen ein kleines eukaryontisches Vorstufenprotein, das Prepromelittin der Honigbiene, als "Modellprotein" benutzt. Dieses Protein mit 8kD Molekulargewicht wird in der Giftdrüse der Bienenkönigin mit einer typischen Signalsequenz synthetisiert (Suchanek et al., 1978; Vlasak et al., 1983) und als carboxyterminal amidiertes Promelittin (Habermann, 1972), dem löslichen und inaktiven Vorläufer des membranaktiven und lytischen Peptids Melittin, in den Giftsack sezerniert (Kreil, 1984). Die Abspaltung der Prosequenz erfolgt durch eine, ebenfalls in diesen mit Chitin ausgekleideten extrazellulären Raum der Giftdrüse sezernierte Dipeptidylaminopeptidase (Kreil et al., 1980a und b). Das reife Melittin besitzt amphipathische Eigenschaften und tritt deshalb mit biologischen Membranen oder künstlichen Lipiddoppelschichten in Wechselwirkung (Faucon et al., 1979). In Lösung liegt Melittin in zwei

stabilen Konformationen vor: in einer monomeren und in einer tetrameren Form (Talbot et al., 1979; Bello et al., 1982). Eine Änderung der Konformation hängt von der Konzentration an Melittin, der Salzkonzentration und vom pH der Lösung ab (Terwilliger und Eisenberg, 1981; Georghiou et al., 1982). Eine wichtige biologische Wirkung von Melittin liegt in der Erhöhung der Aktivität des Enzyms Phospholipase A₂, einer anderen Komponente des Bienengifts (Mollay et al., 1979). Ferner weist Melittin als Tetramer in der Membran ionophore Eigenschaften auf (Drake und Hider, 1979). Neueren Ergebnissen zufolge überspannt Melittin die Membran nicht, sondern wird an der Oberfläche der Membran keilförmig in nur eine Hälfte der Lipiddoppelschicht inkorporiert (Schulze et al., 1987).

Untersuchungen zum Transport von Prepromelittin in Hundepankreas-Mikrosomen in vitro hatten gezeigt, daß die Insertion von Prepromelittin in die mikrosomale Membran tatsächlich post-translational stattfindet (Zimmermann und Mollay, 1986). Prepromelittin wurde dabei im Kaninchen-Retikulozytenlysat mit einem apparenten Molekulargewicht von 8kD synthetisiert und in Abwesenheit von Proteinsynthese von Mikrosomen zu Promelittin prozessiert. Die Insertion von Prepromelittin in und der Transfer von Promelittin über die mikrosomale Membran erfolgte auch in Abwesenheit eines funktionellen SRP/Dockingprotein-Systems. Dazu wurde Dockingprotein proteolytisch durch Abspaltung der cytoplasmatischen Domäne (52kD) seiner α -Untereinheit inaktiviert. Für den Membrantransfer von Promelittin wurde die Aktivität einer proteasesensitiven Komponente der mikrosomalen Membran benötigt. Nach Behandlung der Mikrosomen mit Trypsin fand Prozessierung von Prepromelittin, aber keine Sequestrierung von Promelittin statt. Die Identität der proteasesensitiven Kompo-

nente mit Dockingprotein wurde ausgeschlossen. Die Rekonstitution von mit Trypsin vorbehandelten Mikrosomen mit einem Extrakt aus Mikrosomen, welcher das abgespaltete 52kD-Fragment des Dockingproteins enthielt (Meyer und Dobberstein, 1980), stellte die Prozessierung und Sequestrierung von Dockingprotein-abhängigen Vorstufenproteinen in Mikrosomen wieder her, nicht jedoch die Sequestrierung von Promelittin.

Die Befähigung zu diesem Transportverhalten muß in der Struktur von Prepromelittin begründet sein. Die Primärstruktur von Prepromelittin zeichnet sich aus durch i) kleine Größe, ii) eine typische eukaryontische Signalsequenz, iii) eine Prosequenz mit acht negativ geladenen Aminosäuren, iv) eine hydrophobe Domäne innerhalb des reifen Melittins und v) eine Folge von vier positiv geladenen Aminosäuren nahe des Carboxylendes.

1.7. Zielsetzung dieser Arbeit

Zuächst sollten die strukturellen Voraussetzungen für Unabhängigkeit von SRP und Dockingprotein sowie für Abhängigkeit von der proteasesensitiven Komponente der mikrosomalen Membran durch Veränderung der charakteristischen Merkmale in der Primärstruktur von Prepromelittin ermittelt werden. Aus dieser Mutationsanalyse sollte - falls möglich - die für den Transport erforderliche Tertiärstruktur dieses Vorstufenproteins abgeleitet werden. Daraufhin sollte der Einfluß der Konformation und von Energie während einzelner Schritte des Transports in Mikrosomen untersucht werden. Es sollten einzelne Transportschritte durch die Anhäufung von Intermediaten voneinander entkoppelt oder - falls möglich - in "membranfreien" löslichen in vitro Systemen analysiert werden. Abschließend sollte versucht werden, auch für größere Vorstufenproteine, die sich der posttranslationalen

Untersuchung ihres Transports in Mikrosomen entziehen, zu Schlüssen über die generelle Bedeutung der Konformation für den Transport zu gelangen. Insgesamt sollten die Studien zu einem besseren Verständnis des molekularen Transportmechanismus' von Proteinen über die Membran des endoplasmatischen Retikulums führen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Die bei dieser Arbeit benutzten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

[^{35}S]Cystein (1100-1400Ci/mmol), [^3H]Leucin (100Ci/mmol),

[^{35}S]Methionin (1000Ci/mmol), [^3H]Prolin (100Ci/mmol):

Amersham-Buchler, Braunschweig;

[α - ^{32}S]dATP (1500Ci/mmol), [γ - ^{32}P]ATP (2000Ci/mmol):

Dupont New England Nuclear, Boston;

Cap-Analogon 7mG(5')ppp(5')G, Didesoxy-, Desoxy-, Ribonukleotide,

Exonuklease S1, Ficoll, Klenow-Fragment der E.coli

DNS-Polymerase I (kloniert), PEG 6000 und 8000, T4 DNS-Ligase

(kloniert), T4 Polynukleotidkinase:

Pharmacia P-L Biochemicals, Freiburg;

Restriktionsenzyme NsiI und Sau96A: New England Biolabs;

Agarose (ultrapure, low endoosmosis):

BRL, Gaithersburg, MD, USA;

Ribonuklease-Inhibitor (RNasin aus menschlicher Plazenta),

T4 DNS-Polymerase: Promega Biotec;

AMPS, Apyrase (Grad VIII aus Kartoffeln), Cycloheximid, Häm-in,

Heparin, Kreatinphosphat, Mercaptoethanol, Methotrexat, PMSF,

Puromycin, Trypsin (Typ XIII aus Hundepankreas, 10000U/mg):

Sigma, München;

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm), BSA (Qualität für Molekularbiologie), Cäsiumchlorid, DTT, Ethidiumbromid, Exonuklease Bal31, Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase I, Kreatinkinase, Nuklease aus Staphylococcus aureus, Proteinase K, Restriktionsendonukleasen, Ribonuklease A, SP6 RNS-Polymerase, T4 DNS-Ligase, Trypsininhibitor (aus Sojabohnen): Boehringer, Mannheim; Acrylamid, Ampicillin, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Chloramphenicol, Ethanol, Harnstoff, Lysozym, Nembutal, Saccharose (DNase und RNase frei), SDS, Spermidin, TEMED, Tetracyclin: Serva, Heidelberg; KAc, Trichloressigsäure: Riedel-De-Haen, Hannover-Seelze; Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefe-Extrakt: Difco Lab., Detroit, Mich., USA; Szintillationsflüssigkeit ACS II, Amersham-Buchler, Braunschweig; Röntgenfilm Entwickler und Fixierer: Tetanal-Photowerke, Hamburg; Alle übrigen Chemikalien: Merck, Darmstadt; DEAE-Membran, Faltenfilter, Nitrocellulosemembran: Schleicher und Schüll, Dassel; Dialyseschlauch Visking 18/32: Medicell, London, England; Röntgenfilm X-Omat AR-5: Kodak, München.

2.1.2. Geräte

Fraktionssammler, Gradientenmischer, Spannungsgeräte für die Polyacrylamidgelelektrophorese: Pharmacia, Freiburg; Spannungsgeräte für die Agarosegelelektrophorese: Consort, Freiburg; Airfuge, Kühlzentrifugen J2-21 und Ultrazentrifugen der L8-Serie und dazugehörige Festwinkel-, Ausschwing- und Vertikalrotoren: Beckman Instr., München;

Kühlzentrifuge RC-5: Sorvall, Boston, Massachusetts, USA;

Tischzentrifugen Bactifuge, Biofuge und Digifuge:

Heraeus Christ, Osterode;

Flüssigszintillationszähler TriCarb460:

Packard Instr. Comp., Downes Grove, Illinois, USA;

Pipetten, Schüttler, Thermostaten, Tischzentrifugen:

Eppendorf, Hamburg;

Temperierte Wasserbäder: Julabo, Seelbach;

Dispensierpipetten, Elektrophoreseapparatur für DNS-Poly-
acrylamidgele, Laserdensitometer Ultrascan XL: LKB, München;

Waring-Blendor und Vortex-Mixer:

Bender und Hohbein, Zürich/München;

Magnetrührer: Ika, Staufen;

Pipetten Gilson: Abimed, Düsseldorf;

Photometer UV-120-02 und UV-240: Shimadzu, Kyoto, Japan;

Photometer UVIDEC-4: Jasco, Japan;

Schüttelwasserbäder: Braun, Melsungen;

Schüttelschränke: Memmert, Hannover;

Schüttelmaschine LS10: Gerhardt, Bonn;

Sterilbank: BDK, Hamburg;

Fein-Waagen: Sartorius, Mainz;

Entwicklungsmaschine Gevomatic 60: Agfa Gevaert, München;

Evaporator Speed Vac: Bachofer, Reutlingen;

HPLC-Apparatur: Water Associates, Milford, USA.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Aufbewahrung von transformierten E.coli-Zellen als

Glycerinstammkulturen

1,5ml einer über Nacht gewachsenen Kultur von E.coli ($OD_{550} \sim 3$) in mit 100µg/ml Ampicillin oder 50µg/ml Tetracyclin oder 25µg/ml Chloramphenicol supplementiertem LB-Medium (10g Bacto-Trypton, 5g Hefe-Extrakt, 5g NaCl auf 1l H_2O) (Kedes et al., 1967) wurden mit 3ml sterilem Glycerin (80%) versetzt, gut gemischt und bei $-20^\circ C$ aufbewahrt.

2.2.1.2. Isolierung von Plasmiden

Plasmide wurden nach dem Verfahren der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) isoliert.

2.2.1.2.1. Präparationen im großen Maßstab

800ml LB-Medium, supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, wurden mit 100µl einer Glycerinstammkultur angeimpft und mit 165Upm bei $37^\circ C$ für 12-16Std. geschüttelt. Die stationäre Kultur ($OD_{550} \sim 3$) wurde durch Zentrifugation bei $8000 \times g$ für 10min bei $4^\circ C$ geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und der Niederschlag an Zellen in 20ml GET-Puffer (25mM Tris/Cl pH 8,0; 10mM EDTA; 50mM Glukose), supplementiert mit 100mM Lysozym, bei $4^\circ C$ suspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde die Suspension für 5min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert, sodann mit 40ml Lysis-Puffer (0,2N NaOH; 1% w/v SDS) versetzt und für 5min bei $0^\circ C$ vorsichtig geschüttelt. Nach Neutralisierung mit 30ml N-Puffer (5M K-Acetat pH 4,8) und vorsichtigem Schütteln wurde die Lösung noch 10min bei $0^\circ C$ inkubiert und daraufhin mit $8000 \times g$ für 15min bei $4^\circ C$ zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert und mit 60ml

Isopropanol für 15min bei Raumtemperatur ausgefällt. Der Präzipitat wurde mit 8000xg für 30min bei 25°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das von Überstandsresten sorgfältig befreite Sediment wurde in 8ml TE-Puffer (10mM Tris/Cl pH 7,4; 1mM EDTA) gelöst. Nach Zugabe und Lösen von 9g Cäsiumchlorid wurde die Lösung mit 1ml Ethidiumbromid (0,5% w/v Ethidiumbromid) versetzt, für 15min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 15000xg für 30min bei 25°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im Vertikalrotor einer Dichtegradientenzentrifugation (150000xg, 18°C, 10Std.) unterworfen (Radloff et al., 1967). Die Bande mit geschlossenem, zirkulärem Plasmid wurde aus dem CsCl-Gradienten durch Abziehen mit einer Spritze (Vol. 1ml) isoliert und mit 1ml TE-Puffer 1:2 verdünnt. Die DNS wurde mit 5ml absolutem Ethanol für 2Std. bei -80°C ausgefällt. Das präzipitierte CsCl wurde durch Erwärmen gelöst und die gefällte DNS wurde durch Zentrifugation in der Bactifuge für 30min bei 3500Upm sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, der Niederschlag wurde 30min lang unter Vakuum getrocknet und sodann in 500µl TE-Puffer aufgenommen. Nach zwei Extraktionen mit jeweils 500µl wassergesättigtem Butanol, drei Extraktionen mit je 1ml Phenol/Chloroform (50% v/v Phenol, gesättigt mit 50mM Tris/Cl pH 7,4; 46% v/v Chloroform; 4% Isoamylalkohol) und zwei Extraktionen mit je 500µl Chloroform (96% v/v Chloroform; 4% v/v Isoamylalkohol) wurde die Lösung mit 40µl 3M NaAc (pH 5,2) und mit 1ml absolutem Ethanol versetzt. Das Plasmid wurde 1Std. bei -80°C ausgefällt und durch Zentrifugation (12000xg, 10min, 4°C) sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde der Niederschlag zweimal mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und dann 30min unter Vakuum getrocknet. Das Plasmid wurde in einem kleinen Volumen TE-Puffer aufgenommen und nach

Messung der OD₆₀₀ mit TE-Puffer auf eine DNS-Konzentration von 1-2 µg/ul verdünnt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.2.2. Präparationen im kleinen Maßstab

Zweimal 1,5ml einer mit einer Einzelkolonie angeimpften E.coli-Übernachtskultur in mit Antibiotikum supplementiertem LB-Medium wurden nacheinander in der Eppendorf-Zentrifuge 1min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt, die sedimentierten Zellen wurden in 100µl eiskaltem GET-Puffer ohne Lysozym resuspendiert und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Lysis-Puffer und vorsichtigem Schwenken wurde erneut für 5min bei 0°C inkubiert, die Lösung mit 150µl N-Puffer versetzt, vorsichtig gemischt und die Inkubation für 5min bei 0°C fortgesetzt. Nach Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge, 5min, Raumtemperatur) wurde dem Überstand RNase A (2mg/ml) zugegeben und es wurde für 20min bei 37°C inkubiert. Es folgten zwei Extraktionen mit 500µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und zwei Extraktionen mit 450µl Chloroform/Isoamylalkohol. Die obere Phase (~400µl) wurde mit 1ml absolutem Ethanol für 5min bei Raumtemperatur versetzt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 5min, Raumtemperatur), zweimal mit je 1ml eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 32µl TE-Puffer gelöst. Die DNS-Lösung wurde daraufhin mit 8µl 4M NaCl und 40µl 13% PEG 8000 versetzt, gut gemischt (Vortex-Mixer) und für 20min bei 0°C inkubiert. Das gefällte Plasmid wurde sedimentiert (Eppendorffzentrifuge, 10min, Raumtemperatur). Der Niederschlag wurde mit 1ml eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in 50µl TE-Puffer gelöst. Die Plasmide wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.3. Enzymatische Modifikationen von Desoxyribonukleinsäuren

2.2.1.3.1. Verdau von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Für präparative Verdaus wurden routinemäßig 20µg DNS in einem Reaktionsvolumen von 100µl eingesetzt, für analytische Verdaus von DNS aus großen oder kleinen Plasmidpräparationen 5µg DNS in einem Volumen von 20µl. Gemäß den optimalen Reaktionsbedingungen der Enzyme wurden 10xPuffer mit drei verschiedenen Salzkonzentrationen benutzt (Maniatis et al., 1982):

Puffer (Salzkonz.)	NaCl	Tris/Cl (pH 7,5)	MgCl ₂	DTT
"niedrige"	0	10mM	10mM	1mM
"mittlere"	50mM	10mM	10mM	1mM
"hohe"	100mM	50mM	10mM	1mM

Für Verdaus mit Restriktionsenzym SmaI wurde folgender 10xPuffer eingesetzt: 20mM KCl, 50mM Tris/Cl (pH 8,0), 10mM MgCl₂, 1mM DTT

Eine typische Reaktion wurde nach folgendem Schema zusammenpipetiert:

4µl DNS-Lösung (~5µg)
2µl 10xPuffer
2µl BSA (1mg/ml)
0,5- 2µl Enzymlösung in 50% Glycerin
11,5-10µl steriles H ₂ O (über Millipore-Anlage filtriert und autoklaviert)
----- 20µl Gesamtvolumen

A) Vollständiger Verdau

Vollständige präparative Verdaus von über Gradienten gereinigten Plasmiden wurden über Nacht, von Plasmiden aus Minipräparationen für 2-3Std. bei 37°C (oder im Fall von Restriktionsenzym TaqI bei 65°C) im Brutschrank durchgeführt. Die benötigte Mindestmenge an

Enzym wurde aus der Volumenaktivität der jeweiligen Enzympräparation nach Umrechnung von λ -Phagen-DNS auf die entsprechende Plasmid-DNS ermittelt. Routinemäßig wurde für den Verdau von Minipräparationen das doppelte, für Verdaus über Nacht die Hälfte der errechneten, d.h. für den vollständigen Verdau in 1Std. benötigten Enzymmenge eingesetzt.

B) Teilweiser Verdau

Der unvollständige Verdau wurde mit 1/10 der für den vollständigen Verdau errechneten Enzymmenge für verschiedene Zeiten von 10-120min im analytischen Maßstab bei 25°C durchgeführt und durch Agarosegelelektrophorese untersucht. Die daraus ermittelte optimale Inkubationszeit kam beim Verdau im präparativen Maßstab zur Anwendung.

2.2.1.3.2. Verdau von DNS mit unspezifischen Nukleasen

A) Nuklease Bal31

Zur Herstellung einer Serie von verkürzten Plasmiden wurde 40µg mit Ethanol gefällte und an geeigneter Stelle linearisierte DNS (~3,7kbp) in 100µl mit BSA supplementiertem (500µg/ml) TE-Puffer gelöst und mit dem gleichen Volumen an 2xBal31-Puffer (24mM CaCl₂; 24mM MgCl₂; 0,4M NaCl₂; 2mM EDTA; 40mM Tris/Cl pH 8,0) versetzt. Nach Inkubation für 3min bei 30°C wurden 0,5µl Nuklease Bal31 (2U/µl) zugegeben und die Inkubation für 25min bei 20°C fortgesetzt (Lau und Gray, 1979). In Abständen von einer Minute wurden Aliquots von 8µl entnommen, sofort auf 0°C abgekühlt und mit 2µl 100mM EGTA (pH 8,0) versetzt. Der Ansatz wurde dreifach mit TE-Puffer verdünnt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNS anschließend mit Ethanol gefällt. Die Hälfte des Ansatzes wurde zur Ermittlung der Zahl an deletierten Nukleotiden mit

geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Unter den angegebenen Bedingungen wurden pro Minute etwa 10Bp pro Ende einer doppelsträngigen DNS entfernt. Die andere Hälfte des Bal31-Verdaus wurde zur weiteren Klonierung benutzt.

Zur Entfernung eines Stopkodons in unmittelbarer Nähe einer Restriktionsschnittstelle (weniger als 10 zu entfernende Basenpaare) wurde die Konzentration an NaCl im 2xBal31-Puffer auf 100mM herabgesetzt und die Dauer des Verdaus auf 0,5-2min begrenzt.

B) Nuklease S1

2µg linearisierte DNS mit 5'- oder 3'-überhängenden Enden in TE-Puffer wurde mit 0,1U Nuklease S1 in 200mM NaCl, 50mM NaAc (pH 4,5), 2mM ZnSO₄, 0,5% Glycerin in einem Volumen von 25µl für 10min bei 30°C inkubiert (Vogt, 1973). Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf 0°C und Zugabe von 1µl 0,1M EDTA beendet. Nach Reinigung durch Extraktionen mit Phenol/Chloroform und Chloroform und anschließender Fällung mit Ethanol wurde die nun stumpfendige DNS weiter verarbeitet. Sollte die DNS in den Doppelstrang hinein verdaut werden, wurden 2U Nuklease S1 benutzt. Dies führte bei Plasmiden mit ~3,5kBp zur Entfernung von ~5-20Bp/min pro Ende des DNS-Moleküls (Maniatis et al., 1976).

C) T4 DNS-Polymerase

2µg linearisierte DNS mit 3'-überhängenden Enden in TE-Puffer wurde mit 2,5U T4 DNS-Polymerase in 33mM Tris-Acetat (pH 7,9), 66mM KAc, 10mM MgCl₂, 0,5mM DTT, 100µg/ml BSA in Gegenwart von allen vier dNTPs (0,2mM) in einem Volumen von 25µl für 5min bei 37°C inkubiert (O'Farrell et al., 1980). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 0,5M EDTA, Erhitzen auf 70°C für 5min und

anschließende Extraktion mit Phenol/Chloroform beendet. Die mit Ethanol gefällte DNS wurde in 50µl TE-Puffer gelöst, durch eine kleine Sephadex G-50 Säule zentrifugiert und nach erneuter Ethanolfällung weiterverarbeitet. Falls die DNS nicht stumpfendig gemacht, sondern bis zu einer bestimmten, zum ersten Mal im Doppelstrang auftretenden Base in das 3'-Ende hinein verdaut werden sollte, war von den vier Desoxynukleotiden nur das entsprechende dNTP (0,2mM) während der Reaktion anwesend.

2.2.1.3.3. Synthese von DNS

A) Auffüllen von 5'-überhängenden DNS-Enden

2µg linearisierte DNS mit 5'-überhängenden Enden in TE-Puffer wurde mit 2U Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase I in 50mM Tris/Cl (pH 7,2), 10mM MgSO₄, 0,1mM DTT, 500µg/ml BSA in Gegenwart von allen vier dNTPs (0,1mM) in einem Volumen von 25µl für 30min bei 25°C inkubiert (Drouin, 1980; Wartell und Reznikoff, 1980). Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 5min beendet und die nun stumpfendige DNS entweder nach Zugabe von NaCl einem weiteren Restriktionsverdau unterzogen oder nach Zugabe von 1µl 0,5M EDTA und Extraktion mit Phenol/Chloroform mit Ethanol gefällt und weiterverarbeitet. Falls erforderlich wurde der Ansatz vor der Phenol-Extraktion durch eine kleine Sephadex G-50 Säule zentrifugiert.

B) Sequenzreaktion mit Plasmid-DNS

Die für ein Hybridgen kodierende und zu sequenzierende cDNS wurde in den Polylinker des Plasmids pUC19 (Vieira und Messing, 1982) kloniert. 4µg der über einen CsCl-Gradienten gereinigten Plasmid-DNS in 20µl TE-Puffer wurden mit 2µl 2M NaAc (pH 6,0) und 55µl absolutem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (10min, Eppendorffzentrifuge, 4°C) wurde der Nie-

derschlag zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 20µl 0,2M NaOH, 0,2mM EDTA gelöst (Guo et al., 1983). Die Lösung wurde für 5min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 2µl 2M NH₄Ac (pH 4,8) und 55µl absolutem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach erneutem Zentrifugieren, Waschen und Trocknen des Präzipitats wurden 0,5µl Primer (16pmol/µl), 1,5µl 10xPuffer (50mM Tris/Cl pH 7,5; 50mM MgCl₂; 1mM EDTA; 50mM DTT), 2µl [³⁵S]dATP und 10µl H₂O zugegeben und gut gemischt. Der DNS-Niederschlag wurde darin gelöst und für 15min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1µl Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase I (4U/µl) (Klenow und Henningsen, 1970) wurden für die Nukleotid spezifischen Abbruchreaktionen je 3µl des Ansatzes in vier verschiedene, auf Eis vorgelegte Nukleotidmischungen (2µl) pipettiert (Sanger et al., 1977; Chen und Seeburg, 1985).

	"A"-Reaktion	"G"-Reaktion	"C"-Reaktion	"T"-Reaktion
dGTP	100µM	5µM	100µM	100µM
dCTP	100µM	100µM	10µM	100µM
dTTP	100µM	100µM	100µM	5µM
ddATP	125µM	ddGTP 100µM	ddCTP 300µM	ddTTP 1200µM
(Als Puffer für die Mischungen kam der oben beschriebene 10xPuffer in einfacher Endkonzentration zur Anwendung)				

Nach Inkubation für 20min bei 30°C wurde 1µl "Chase"-Mischung (0,5mM dNTPs in H₂O, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt) zugegeben und die Reaktion für 15min bei 30°C fortgesetzt. Daraufhin wurden die Proben auf 0°C abgekühlt, unter Vakuum eingeengt ("speed vac" Zentrifuge, 20min) und in 4µl Formamid Dye Mischung (0,1% w/v Xylencyanol; 0,1% w/v Bromphenolblau; 10mM EDTA; 95% v/v deionisiertes Formamid) gut resuspendiert. Nach Erhitzen für 3min

auf 95°C wurden die vier Sequenzreaktionen entweder sofort analysiert oder bei -20°C aufbewahrt.

C) Oligonukleotid gesteuerte Mutagenese

Herstellung von einzelsträngiger DNS

Die für ein Hybridgen kodierende und zu mutagenisierende cDNS wurde in den Polylinker des Plasmids pMa5-8 kloniert (Kramer et al., 1984). Eine Übernachtskultur von mit diesem Plasmid transformierten E.coli-Zellen in Ampicillin enthaltendem LB-Medium wurde 1:50 mit LB-Medium ohne Antibiotikum verdünnt und bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen von $OD_{600} = 0,1$ wurde die Kultur mit Helferphagen M13KO7 mit einer m.o.i. ~ 20 infiziert und für 4-5 Std. bei 37°C geschüttelt. Zellen aus 10ml Kultur wurden sedimentiert (Sorvall Rotor HB4, 10000Upm, 10min). Der Überstand wurde abgenommen, mit 2,5ml PEG-Lösung (20% PEG 6000; 2,5M NaCl) versetzt, gemischt und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Die präzipitierten Phagen wurden durch Zentrifugation (Sorvall Rotor HB4, 8000Upm, 10min) sedimentiert und der Niederschlag wurde in 3ml TE-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 3ml mit TE-Puffer gesättigtem Phenol wurde für 20sec kräftig gemischt (Vortex-Mixer) und für 10min in einem Eppendorf-Schüttler bei Raumtemperatur geschüttelt. Daraufhin wurde 3min in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert, die wäßrige Phase abgenommen und einer Extraktion mit Chloroform unterworfen. Die freigesetzte einzelsträngige DNS wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen 5M NaClO₄ mit einem Volumen Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (Eppendorfszentrifuge, 20min) sedimentiert, der Niederschlag wurde getrocknet, in 200µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Die Ausbeute an einzelsträngiger DNS wurde photometrisch bestimmt ($\sim 1,5\text{-}3\mu\text{g/ml}$ Kultur). Das Verhältnis

einzelsträngiger Plasmid-DNS zu einzelsträngiger Phagen-DNS wurde durch Analyse der einzelsträngigen DNS mit Agarosegelelektrophorese im Vergleich zu Phagen-DNS bekannter Konzentration ermittelt (~20:1).

Herstellung der "gapped duplex" DNS

0,1pmol des im Polylinker geöffneten und über Agarosegel gereinigten Plasmids pMc5-8 wurde mit 0,5pmol der einzelsträngigen Plasmid-DNS gemischt. Nach Zugabe von 5µl 1,5M KCl, 100mM Tris/Cl (pH 7,5) und H₂O wurde der Ansatz mit einem Endvolumen von 40µl zuerst für 4min bei 100°C und dann für 10min bei 65°C inkubiert. Die Bildung von "gapped duplex" DNS wurde durch Agarosegelelektrophorese eines Aliquots (~20µl) kontrolliert (Zagursky und Berman, 1984).

Hybridisierung des Oligonukleotids mit der "gapped duplex" DNS und Auffüllreaktion

8µl der "gapped duplex DNS" wurden mit 2µl des phosphorylierten Oligonukleotids (4-8pmol) gemischt, für 5min bei 65°C inkubiert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 24µl H₂O, 4µl Reaktionspuffer (625mM KCl; 275mM Tris/Cl pH 7,5; 150mM MgCl₂; 20mM DTT; 0,5mM ATP; 0,25mM dNTPs), 1µl T4 DNS-Ligase (kloniert, 5U/µl) und 1µl Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase I (kloniert, 1U/µl) wurde der Ansatz für 45min bei Raumtemperatur inkubiert (Levinson et al., 1984).

Koloniehybridisierung mit markierten Oligonukleotiden

Kolonien transformierter E.coli-Zellen wurden auf Nitrozellulosefilter übertragen. Die gebackenen Filter (2Std., 80°C, Vakuum) wurden in Petrischalen mit 10ml/100cm² 6xSSC (3M NaCl; 0,3M NaCitrat; 0,01M EDTA; pH 7,2), 10xDenhardt (0,2% w/v BSA; 0,2%

w/v Polyvinylpyrrolidon; 0,2% w/v Ficoll), 0,1N NaOH, 0,2% w/v SDS für 2Std. bei 67°C inkubiert. Daraufhin wurden die Filter zweimal mit je 50ml 6xSSC für 1min bei 23°C gewaschen, in Gegenwart von 4ml/100cm² 6xSSC, 10xDenhardt und 25µl [γ -³²P]endmarkiertem Oligonukleotid (10⁴Cerenkov/µl) in eine Folie eingeschweißt und für 3Std. bei 23°C inkubiert. Die Filter wurden sodann dreimal mit je 50ml 6xSSC, 10xDenhardt für 10min bei Raumtemperatur gewaschen und auf Filterpapier getrocknet (Grunstein und Hogness, 1975). Nach Autoradiographie (1Std., Raumtemperatur) wurden die Filter nacheinander bei höheren Temperaturen (in 5°-Schritten bis 73°C) gewaschen, wobei nach jedem Waschen eine Autoradiographie erfolgte.

2.2.1.3.4. Phosphorylierung von Oligonukleotiden

4µg einzelsträngige, über ein Polyacrylamidgel gereinigte, synthetische Oligonukleotide (0,5mg/ml) in TE-Puffer wurden mit 2,5µl T4 Polynukleotidkinase (2U/µl)(Richardson, 1971) in 66mM Tris/Cl (pH 7,6), 1mM Spermidin, 10mM MgCl₂, 15mM DTT, 200µg/ml BSA, 0,1mM EDTA, 5% v/v Glycerin in Gegenwart von 1mM ATP und 12% (w/v) PEG 8000 in einem Volumen von 20µl für 60min bei 37°C inkubiert (Harrison und Zimmerman, 1986). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 0,5M EDTA beendet. Die phosphorylierten Oligonukleotide wurden entweder über ein Polyacrylamidgel gereinigt oder unmittelbar durch Fällung mit Ethanol in Gegenwart von 300mM NaAc (pH 5,2), 10mM MgCl₂ über Nacht bei -80°C konzentriert. Dabei wurde auf Waschen des Niederschlags mit 70% Ethanol verzichtet.

Die radioaktive Markierung der Oligonukleotide erfolgte mit 10pmol [γ -³²P]ATP (~20µCi) anstelle von unmarkiertem ATP in Gegenwart von 10U T4 Polynukleotidkinase. Zur Kontrolle der

Effizienz des Einbaus von [32 P] wurde 1 μ l der Reaktionsmischung auf Whatman DE-81 Papier aufgetragen und mit 0,3M Ammoniumformat als Flußmittel eine aufsteigende Papierchromatographie durchgeführt. Die Auftragsregion (Oligonukleotid) und die Frontregion (freies ATP) wurden aus dem Papier ausgeschnitten und die Radioaktivität wurde bestimmt ($\sim 2-6 \times 10^6$ Cerenkov/pmol Oligonukleotid).

2.2.1.3.5. Dephosphorylierung von DNS

2 μ g linearisierte DNS in TE-Puffer wurden in 50 μ l 50mM Tris/Cl (pH 9,0), 1mM MgCl₂, 0,1mM ZnCl₂, 1mM Spermidin mit 0,5U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm versetzt (Chaconas und van de Sande, 1980). Zur Dephosphorylierung von 5'-überhängenden DNS-Enden wurde zunächst für 30min bei 37°C inkubiert, sodann ein zweites Aliquot an alkalischer Phosphatase zugesetzt und die Inkubation für 30min fortgesetzt. Stumpfendige oder zurückversetzte 5'-Enden wurden durch Inkubation für 15min bei 37°C und anschließend für 15min bei 56°C dephosphoryliert. Daraufhin wurde ein zweites Aliquot an alkalischer Phosphatase zugegeben und die Inkubationen wurden bei beiden Temperaturen wiederholt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 μ l H₂O, 10 μ l 10xSTE-Puffer (100mM Tris/Cl pH 8,0; 1M NaCl; 10mM EDTA), 5% w/v SDS und Erhitzen auf 65°C für 15min beendet. Die dephosphorylierte DNS wurde entweder über ein Agarosegel oder durch mehrere Extraktionen mit Phenol/Chloroform und Chloroform gereinigt.

2.2.1.3.6. Ligation von DNS

A) mit kohäsiven Enden

Die Reaktion wurde mit einer Gesamtmenge an DNS von ~ 500 ng (molares Verhältnis Vektor:Insert=1:5) in einem Volumen von 20 μ l

in 66mM Tris/Cl (pH 7.6), 5mM MgCl₂, 5mM DTT, 1mM ATP in Gegenwart von 1 μ l T4 DNS-Ligase (2U/ μ l) für 16Std. bei 4°C durchgeführt.

B) mit stumpfen Enden

Die Reaktion wurde mit einer Gesamtmenge an DNS von ~500ng (molares Verhältnis Vektor:Insert=1:10) in einem Volumen von 20 μ l in 25mM Tris/Cl (pH 7.4), 5mM MgCl₂, 5mM DTT, 0.25mM Spermidin, 1mM ATP, 1.25mM Hexaminkobaltchlorid, 100 μ g/ml BSA, 10% (v/v) PEG 6000 in Gegenwart von 5U T4 DNS-Ligase durchgeführt (Zimmerman und Pfeiffer, 1983). Nach Inkubation für 16Std. bei 4°C wurden erneut 5U T4 DNS-Ligase zugegeben und die Inkubation wurde für 3Std. bei Raumtemperatur fortgesetzt.

C) mit Oligonukleotiden

Die über ein Polyacrylamidgel gereinigten, komplementären Oligonukleotide wurden zur Hybridisierung im äquimolaren Verhältnis miteinander gemischt, auf 65°C erhitzt, anschließend auf 56°C abgekühlt, für 2Std. inkubiert und sodann langsam auf 37°C abgekühlt. Nach Inkubation für 2Std. bei dieser Temperatur wurde die Ligationsreaktion mit einer Gesamtmenge an DNS von 1 μ g (molares Verhältnis Vektor: Oligonukleotid=1:100) in einem Volumen von 20 μ l in 50mM Tris/Cl (pH 7.4), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM Spermidin, 1mM ATP, 100 μ g/ml BSA, 5% (v/v) Glycerin, 8% (v/v) PEG 6000 in Gegenwart von 10U T4 DNS-Ligase durchgeführt (Pfeiffer und Zimmerman, 1983). Nach Inkubation für 16Std. bei 12°C wurden erneut 10U T4 DNS-Ligase zugefügt und die Inkubation für 8Std. bei 12°C fortgesetzt (Dugaiczky et al., 1975).

2.2.1.4. Gelelektrophorese von DNS

2.2.1.4.1. Agarosegelelektrophorese

Agarosegele wurden zur Auftrennung von DNS-Fragmenten >150Bp benutzt, falls sich diese um mindestens 50Bp voneinander unterschieden.

A) Herstellung der Gele

Die in H₂O gelöste Agarose (0,8%; 1%; 1,6% w/v) wurde bei 70°C aufbewahrt. Vor dem Gießen der Gele wurde 1/50 Vol. 50xTAE-Puffer (2M Tris/Acetat pH 7,5; 50mM EDTA) und 0,5µg/ml Ethidiumbromid (aus einer Stammlösung von 10mg/ml in H₂O) zugegeben und die Lösung auf 50°C abgekühlt. Es wurden horizontale Flachbettgele mit einem Bett-Volumen von 100ml oder 30ml (Minigel) für die simultane Elektrophorese von 14 Proben mit einem Volumen von 25µl bzw. 10µl gegossen.

b) Präparation der Proben und Durchführung der Elektrophorese

Der Elektrophoresetank wurde mit 1xTAE-Puffer, supplementiert mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid, gefüllt, sodaß das Agarosegel zu einer Höhe von ~1mm mit Puffer bedeckt war. Die Proben (0,5-20µg DNS) wurden mit 1/5 Vol. an 5xProbenpuffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 15% Ficoll, Typ 400; 200mM Tris/Ac pH 7,4; 5mM EDTA) versetzt und, falls erforderlich, unmittelbar vor dem Auftragen für 5min auf 65°C erhitzt. Der Elektrophoreselauf wurde unter konstanter Stromstärke (~200mA bzw. 120mA bei Minigel) bei Raumtemperatur durchgeführt und unter UV-Licht kontrolliert. Als Größenstandard wurden routinemäßig 2µg Plasmid pBR322 oder 4µg λ-Bakteriophagen-DNS aufgetragen, die mit den Restriktionsenzymen AluI bzw. HindIII geschnitten worden waren.

2.2.1.4.2. Polyacrylamidgelelektrophorese

A) Gele für Restriktionsanalyse

Polyacrylamidgele wurden zur Auftrennung von DNS-Fragmenten benutzt, die weniger als 150Bp besaßen oder sich voneinander um weniger als 50Bp unterschieden.

Herstellung der Gele

Für 100ml 12%ige (20%ige) Polyacrylamidlösung wurden 40ml (66,6ml) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%/1% w/v) mit 47,9ml (21,3ml) H₂O, 2,1ml Ammoniumpersulfat (3% w/v), 10ml 10xTBE-Puffer (0,9M Tris/Borat pH 7,5; 20mM EDTA) und 30µl TEMED versetzt. Die vertikalen Gele mit einem Volumen von 25ml zur simultanen Elektrophorese von 16 Proben mit einem Volumen bis zu 30µl wurden zwischen zwei Glasplatten mit 0,5mm Abstand gegossen.

Präparation der Proben und Durchführung der Elektrophorese

Es wurde eine vertikale Elektrophorese in einer mit Wasser gekühlten Apparatur durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1xTBE-Puffer. Die Proben (0,2-2µg DNS) wurden wie bei der Agarosegelelektrophorese behandelt. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese zunächst unter konstanter Stromstärke bei 80mA und, nachdem die Proben vollständig in das Gel eingedrungen waren, bei 350mA betrieben. Als Größenstandard dienten 2µg von Plasmid pUC19, welches mit Restriktionsenzym Sau3A geschnitten worden war. Nachdem die Bromphenolblau-Front das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde der Lauf beendet und das Gel für 45min in 1xTBE mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid bei vorsichtigem Schütteln und Raumtemperatur gefärbt und - falls erforderlich - vor der Analyse unter UV-Licht 1Std. in 1mM MgSO₄ inkubiert.

B) Gele für Sequenzanalyse

Herstellung der Gele

Eine 6%ige Acrylamid-Lösung (6.0g Acrylamid; 0.3g Bisacrylamid; 10ml 10xTBE-Puffer; 50µl Ammoniumpersulfat; H₂O auf 100ml) wurde filtriert, unter Vakuum entgast und nach Zugabe von TEMED (100µl/100ml) zwischen zwei Glasplatten (45x13.5cm) mit 0.2mm Abstand gegossen (Garoff und Ansorge, 1981). Am oberen Rand des Gels wurde eine fast über die gesamte Breite des Gels reichende, rechteckige Tasche einpolymerisiert, die während des Probenauftrags ein ~1mm weit in die Kante des Gels gesteckter Kamm mit "Sägezähnen" in 32 kleinere Taschen unterteilte.

Präparation der Proben und Durchführung der Elektrophorese

Es wurde eine vertikale Elektrophorese mit 1xTBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Nach einem Vorlauf für 45min bei konstanter Leistung von 40W und Raumtemperatur wurden die Proben mit den Sequenzreaktionen für 3min auf 95°C erhitzt, sofort auf 0°C abgekühlt und mit einer Glaskapillare in die von den Sägezähnen des Kamms gebildeten Taschen des Gels gefüllt. Nach je vier Proben einer Sequenzreaktion wurde das Gel für 2min unter Strom gesetzt, bevor die nächsten Proben zum Auftrag kamen. Der Elektrophoreselauf wurde unter den Bedingungen des Vorlaufs - je nach Bedarf - für 2-5Std. fortgesetzt. Daraufhin wurde das Gel für 30min vorsichtig in Essigsäure (5% v/v) geschwenkt, auf Filterpapier gelegt und unter Vakuum ~1Std. lang getrocknet. Zur Autoradiographie wurde das Gel 12-48Std. exponiert.

C) Gele zur Reinigung von Oligonukleotiden

Herstellung der Gele

150ml 16%ige Acrylamid-Lösung (22.8g Acrylamid; 0.6g Bisacrylamid; 63g Harnstoff; 15ml 10xTBE-Puffer; 60µl Ammoniumpersulfat;

40µl TEMED) wurde zwischen zwei Glasplatten (45x13,5cm) mit Abstand 1,5mm gegossen. Drei Taschen für ein Probenvolumen von je 100µl wurden einpolymerisiert.

Präparation der Proben und Durchführung der Elektrophorese

100µl der in H₂O gelösten Oligonukleotide (5µg/µl) wurden mit 200µl Formamid-Dye versetzt, unmittelbar vor dem Auftragen für 3min auf 95°C erhitzt und sofort auf 0°C abgekühlt. Sodann wurde eine vertikale Gelelektrophorese mit 1xTBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Nach einem Vorlauf von 30min bei konstanter Leistung von 20W und Raumtemperatur wurden je 100µl der Probe pro Tasche aufgetragen und der Lauf unter gleichen Bedingungen fortgesetzt. Nachdem die Bromphenolblau-Front ~2/3 des Gels durchwandert hatte, wurde der Lauf beendet und die Position des Oligonukleotids im Gel unter UV-Licht mit Hilfe einer Dünnschichtplatte analysiert.

2.2.1.5. Isolierung von DNS aus Agarose- oder Polyacrylamidgelen

2.2.1.5.1. Transfer von Restriktionsfragmenten auf DEAE-Membran

Ein passendes Stück DEAE-Membran wurde in Laufrichtung vor das zu isolierende DNS-Fragment in das Agarosegel gesteckt und die Elektrophorese wurde für 15min bei 200mA fortgesetzt. Die Membran wurde in ein Eppendorfcup überführt, mit 450µl 1.5M NaCl, 20mM Tris/Cl (pH 7,4) versetzt, für 15min bei 65°C inkubiert und in einem neuen Eppendorfcup zum zweiten Mal dieser Prozedur unterworfen. Nach Entfernung der Membran wurden die beiden DNS enthaltenden Lösungen vereint und je zweimal mit Butanol, Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert. Die DNS wurde durch Zugabe von 1ml absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Effizienz des Transfers der DNS vom Gel auf die Membran bzw.

von der Membran in Lösung wurde unter UV-Licht kontrolliert (Dretzen et al., 1981).

2.2.1.5.2. Elektroelution von Restriktionsfragmenten

Das Stück Agarose oder Polyacrylamid mit dem zu isolierenden Restriktionsfragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in einen mit H₂O und Elektrophoresepuffer gewaschenen Dialyseschlauch überführt. Der Dialyseschlauch wurde mit 5ml Elektrophoresepuffer ohne Ethidiumbromid aufgefüllt und in die Elektrophoresekammer gelegt, wobei die Orientierung des isolierten Agarose- bzw. Polyacrylamidgelstücks der im präparativen Agarose- bzw. Polyacrylamidgel entsprach. Die Elektroelution erfolgte für ~30min bei 250mA in Elektrophoresepuffer ohne Ethidiumbromid. Nach dem Umpolen der Spannung für 30sec wurde die DNS enthaltende Lösung dem Dialyseschlauch entnommen, mit 1/5 Volumen an 1M NaCl, Tris/Cl (pH 7,2) versetzt und mit einer Spritze auf eine Ionenaustauschersäule (Elutip) aufgetragen, die mit 2ml 1M NaCl, 10mM Tris/Cl (pH 7,2) und 5ml 0,2M NaCl, 10mM Tris/Cl (pH 7,2) gewaschen worden war. Die DNS wurde mit zweimal 0,5ml 1M NaCl, 10mM Tris/Cl (pH 7,2) von der Säule eluiert und mit 2ml absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Das sedimentierte Präzipitat (Eppendorfzentrifuge, 15min, 4°C) wurde unter Vakuum getrocknet und in 200µl TE-Puffer gelöst. Nach Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform wurde die DNS mit Ethanol gefällt. Die Effizienz des Transfers der DNS vom Gelstück in Lösung wurde unter UV-Licht kontrolliert (McDonnel et al., 1977).

2.2.1.5.3. Elution von Oligonukleotiden

Die Oligonukleotide wurden im Polyacrylamidgel unter UV-Licht mit Hilfe einer Dünnschichtplatte lokalisiert, das entsprechende

Gelstück wurde ausgeschnitten und in einem Eppendorfcup in kleine Stücke zerteilt. Nach Zugabe von 300µl 0,5M NH₄Ac, 1mM EDTA (pH 8,0) wurde über Nacht unter kräftigem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde zentrifugiert (Eppendorfcup, 10min, Raumtemperatur), der Überstand vorsichtig abgenommen, der Niederschlag mit 150µl Elutionspuffer versetzt, kräftig gemischt (Vortex-Mixer) und erneut zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereint und durch eine kleine, mit silikonisierter Glaswolle gefüllte Säule (Pasteurpipette) zentrifugiert (Sorvall, SS34, 2000Upm, 25°C). Die im Durchfluß gelösten Oligonukleotide wurden unter Vakuum ("speed vac" Zentrifuge) auf ein Volumen von 100µl eingeeengt und durch Zugabe von 300µl absolutem Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde sedimentiert (100000xg, 30min, 4°C) und in 50µl TE-Puffer aufgenommen. Die Oligonukleotide wurden erneut mit Ethanol gefällt (Smith, 1980).

2.2.1.6. Reinigung von DNS

2.2.1.6.1. Alkalischer Saccharosegradient

Je ein 1ml 20%ige, 17,5%ige, 15%ige, 10%ige und 5%ige Saccharose-Lösung in 1M NaCl, 0,2M NaOH, 2mM EDTA wurden nacheinander in ein Zentrifugenröhrchen geschichtet und für 16Std. bei 4°C zentrifugiert (Beckman Rotor SW50.1, 40000Upm). Die zweimal mit PEG 6000 (13% und 6,5% w/v) in Gegenwart von NaCl (1,6M und 0,8M) gefällte und in 180µl Tris/Cl (pH 8,0), 1mM EDTA und 20µl 2N NaOH gelöste Probe wurde auf den nun kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetragen und für 2Std. bei 37000Upm und 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde der Gradient fraktioniert. 30 Fraktionen zu je 5 Tropfen wurden gesammelt und einer Radioaktivitätsmessung unterzogen. Die am weitesten unten entnommenen radioaktiven Fraktionen enthielten geschlossene zirkuläre DNS. Sie wurden vereint

(~100µl), mit 1M Tris/Acetat (pH 5,0) neutralisiert, gegen 2mM Tris/Cl (pH 8,0), 0,01mM EDTA dialysiert und durch Gefrier-trocknung 10x konzentriert.

2.2.1.6.2. Phenolextraktion

100-500µl der wäßrigen DNS-Lösung wurden mit dem doppelten Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50% v/v Phenol, mit 50mM Tris/Cl pH 7,4 gesättigt; 46% v/v Chloroform; 4% v/v Isoamylalkohol) versetzt, gut gemischt (Vortex-Mixer) und für 2min in einer Eppendorffzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, mit einem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme der wäßrigen Phase wurde ein gleiches Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (96% v/v Chloroform; 4% v/v Isoamylalkohol) zugesetzt und zentrifugiert. Die reisolierte wäßrige Phase wurde erneut dieser Prozedur unterworfen. Daraufhin wurde die DNS aus der wäßrigen Phase entweder unmittelbar oder nach Äther-Extraktion mit Ethanol gefällt. Falls erforderlich wurde die Zwischenphase und die untere organische Phase der ersten Extraktion mit dem gleichen Volumen an TE-Puffer (pH 7,4) verdünnt und zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase der zweiten Extraktion wurde dann mit der wäßrigen Phase der ersten Extraktion vereint.

2.2.1.6.3. Extraktion mit Äther

Die wäßrige DNS-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen an wasser-gesättigtem Äther versetzt, gut gemischt und für 2-3min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge, 2min, Raumtemperatur) wurde die obere Äther haltige Phase abgenommen und verworfen und die untere wäßrige Phase erneut dieser Prozedur unterzogen. Spuren von Äther in der wäßrigen

Phase wurde durch Erhitzen auf 65°C für 10min oder im Vakuum für 20min entfernt. Die DNS wurde dann mit Ethanol gefällt.

2.2.1.6.4. Extraktion mit Butanol

Zur Entfernung von Ethidiumbromid und organischen Farbstoffen wurde die wäßrige DNS-Lösung mit dem gleichen Volumen an wasser-gesättigtem 2-Butanol versetzt, gut gemischt und zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge, 2min, Raumtemperatur). Die obere organische Phase wurde abgenommen und verworfen. Die untere wäßrige Phase wurde erneut dieser Prozedur unterzogen, sodann mit Äther extra-hiert und mit Ethanol gefällt.

2.2.1.6.5. Chromatographie durch Sephadex G-50

10µg DNS in TE-Puffer wurden mit STE-Puffer (10mM Tris/Cl pH 8,0; 1mM EDTA; 100mM NaCl) auf 100µl verdünnt und auf eine Sephadex G-50 Säule aufgetragen. Die aus einer Spritze (1ml) bestehende und mit steriler Glaswolle abgedichtete Säule besaß ein Bett von 0,9ml Sephadex G-50, äquilibriert mit STE-Puffer. Die Säule wurde in einem Zentrifugenröhrchen aus Glas für 5min bei 1600xg und 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. 100µl Eluat wurden in einem Eppendorfcup aufgefangen. Daraus wurde die DNS mit Ethanol gefällt.

2.2.1.6.6. Fällung mit Ethanol

DNS in 50-350µl TE-Puffer wurde mit 1/10 Vol. an 2,5M NaAc (pH 5,2) und 2,5 Vol. absolutem Ethanol versetzt, gut gemischt und entweder über Nacht bei -20°C oder für 2Std. bei -80°C ausge-fällt. Das Präzipitat wurde in der Eppendorfszentrifuge für 15min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenom-men und verworfen, der Niederschlag wurde zweimal vorsichtig mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Routinemäßig wurde die DNS in TE-Puffer zu einer Konzentration von 1-2µg/µl gelöst. Bei sehr kleinen DNS-Fragmenten (< 150Bp) oder sehr geringen DNS-Konzentrationen (<0,1µg/ml), sowie bei Oligonukleotiden wurde die Fällung in Gegenwart von 10mM MgCl₂ und 0,5M NH₄Ac mit 3 Vol. absolutem Ethanol über Nacht bei -80°C durchgeführt. Das Präzipitat wurde dann durch Zentrifugation bei 100000xg für 30min bei 4°C sedimentiert, getrocknet und ohne einen Waschschrift in TE-Puffer gelöst.

2.2.1.7. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS

Für 10 Transformationen wurden 100ml SOB-Medium (2% Bacto-Trypton; 0,5% Hefe-Extrakt; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl₂; 10mM MgSO₄) mit 1ml einer stationären Übernachtskultur von E.coli (SOB-Medium, mit einer Einzelkolonie von E.coli Stamm HB101 angeimpft) (Mandel und Higa, 1970) versetzt und bei 160Upm und 37°C für 2-3Std. geschüttelt, bis eine OD₅₅₀ ~0,6 erreicht war. Die Kultur wurde sodann 15-30min bei 0°C inkubiert und nachfolgend für 12min bei 4°C und 1500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, der Niederschlag wurde vorsichtig in 33ml TFB-Medium (10mM MES/KOH pH 6,2; 100mM RbCl₂; 45mM MnCl₂; 10mM CaCl₂; 3mM Hexaminkobaltchlorid) resuspendiert und für 15-30min bei 0°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (Beckman Rotor JA10, 2500Upm, 10min, 4°C) und nach Absaugen des Überstandes in 2ml TFB-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 60min bei 0°C inkubiert, sodann mit 70µl DMSO und 5min später mit 70µl DTT (2,25M) versetzt. Nach Inkubation für 10min bei 0°C wurden erneut 70µl DMSO zugegeben und die Inkubation für 5min bei 0°C fortgesetzt. Daraufhin wurden 200µl kompetente Zellen zu 20µl Ligationsmischung pipettiert und bei 0°C für 30min inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzebehandlung für 90sec bei

42°C. Der Transformationsansatz wurde für 1-2min auf 0°C abgekühlt, sodann mit 800µl SOB-Medium, welches mit 0,4% Glukose supplementiert worden war, versetzt und bei leichtem Schütteln (100Upm) für 1Std. bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen sedimentiert (Beckman Rotor JA20, 2000Upm, 5min, 37°C) und der Niederschlag nach Abnahme von 800µl Überstand im restlichen Überstand (~200µl) aufgenommen. 100µl Zellsuspension wurden auf LB-Agarschalen (LB-Medium; 2% Bacto-Agar), die mit dem geeigneten Antibiotikum supplementiert worden waren (100µg/ml Ampicillin oder 50µg/ml Tetracyclin oder 25µg/ml Chloramphenicol), ausplattiert. Die Agarschalen wurden bei 37°C für 16Std. inkubiert. Die restlichen transformierten Zellen wurde bei 4°C aufbewahrt (Hanahan, 1983).

2.2.2. Synthese von Vorstufenproteinen in vitro

2.2.2.1. Transkription mit SP6 RNS-Polymerase

Für Hybridproteine kodierende Plasmide wurden entweder als "supercoils" oder nach Linearisierung außerhalb des Kodierungsbereichs zur Transkription eingesetzt. Im letzten Fall wurde nach dem Restriktionsverdau mit Phenol/Chloroform, Chloroform und Äther extrahiert, mit Ethanol gefällt und im ursprünglichen Volumen TE-Puffer wieder aufgenommen. Die Transkription in vitro von Plasmiden mit SP6 RNS-Polymerase spezifischem Promoter wurde nach Melton et al., (1984), mit Modifikationen nach Galili et al., (1986), gemäß folgendem Pipettierschema in einer Reaktion mit 25µl Gesamtvolumen durchgeführt:

<u>VOLUMEN</u>	<u>STAMMLÖSUNG</u>	<u>ENDKONZENTRATION</u>
15 μ l	40mM Hepes/KOH pH 7,4	24 mM
	6mM Mg-Acetat	3,6mM
	2mM Spermidin	1,2mM
	10mM DTT	6 mM
	100 μ g/ml BSA	60 μ g/ml
	500 μ M ATP	300 μ M
	500 μ M UTP	300 μ M
	500 μ M CTP	300 μ M
	100 μ M GTP	60 μ M
2,8 μ l	5mg/ml Plasmid	200 nM
1,25 μ l	5mM 7mG(5')ppp(5')G	250 μ M
0,75 μ l	30U/ μ l RNasin	0,9 U/ μ l
1,0 μ l	20U/ μ l SP6 RNS-Polymerase	0,8 U/ μ l
4,2 μ l	steriles Wasser	
----- 25,0 μ l		

Nach Inkubation für 45min bei 40°C wurde das Reaktionsgemisch entweder sofort zur Translation in vitro eingesetzt oder nach Zugabe von 2,5 μ l 3M NaAc (pH 5,2) mit 75 μ l absolutem Ethanol für 1Std. bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde sedimentiert (Eppendorffzentrifuge, 15min, 4°C), getrocknet, in 5 μ l sterilem Wasser aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.2. Translation im zellfreien System

2.2.2.2.1. Herstellung des Kaninchen-Retikulozytenlysats

Am ersten Tag wurde dem Kaninchen (1,5-2,5kg) 1ml einer Vitaminlösung (0,1mg Cyanocobalamin; 1mg Folsäure; 0,9% w/v NaCl; pH 7,5) intramuskulär in den Hinterlauf und zudem 0,25ml/kg einer Phenylhydrazinlösung (2,5% w/v Na-Phenylhydrazin; 0,9% w/v NaCl;

pH 7,5) subcutan in den Rücken injiziert (Gilbert und Anderson, 1971). Die Phenylhydrazininjektion wurde an den vier darauffolgenden Tagen wiederholt, am sechsten und siebten Tag jedoch unterlassen. Am achten Tag wurde den anämisch gewordenen Tieren das Blut durch Herzpunktion entnommen. Dazu wurde dem Kaninchen zunächst zur Gerinnungshemmung 1ml einer Heparinlösung (5000U/ml Heparin; 0,9% w/v NaCl; pH 7,5) und anschließend durch die gleiche Kanüle 1ml/kg einer Nembutallösung (65mg/ml Nembutal; 0,9% w/v NaCl; pH 7,5) intravenös in die Ohrvene gespritzt. Sofort nach Wirkung der Betäubung wurde der Brustraum eröffnet und das Herz punktiert. Das Blut wurde in autoklavierten Glaszentrifugenbechern aufgefangen, in die ein gleiches Volumen einer eiskalten sterilen Salzlösung (130mM NaCl; 5mM KCl; 7,5mM MgCl₂; 12,5U/ml Heparin; pH 7,5) vorgelegt worden war (Hunt und Jackson, 1974). Zur Gewinnung der Retikulozyten wurde das verdünnte Kaninchenblut für 10min bei 4000Upm und 4°C zentrifugiert (Heraeus-Digifuge, Tragringsrotor). Der Überstand und die dem Sediment aufliegende Schicht (Leukozyten) wurden abgesaugt und verworfen, während das Sediment (Retikulozyten) in Salzlösung ohne Heparin aufgenommen, erneut zentrifugiert und noch dreimal dieser Waschprozedur unterworfen wurde. Dabei wurden jedesmal Überstand und Leukozytenschicht sorgfältig entfernt. Die gereinigten Retikulozyten wurden durch Zugabe eines gleichen Volumens (bezogen auf das Volumen des Sediments) an eiskaltem sterilen Wasser unter leichtem Rühren für 5min bei 0°C lysiert. Nach Zentrifugation (30000xg, 15min, 4°C) wurde der nun als Retikulozytenlysate definierte Überstand (Zimmermann et al., 1979) abgenommen, in Portionen von 800ul in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Das Sediment (Zelltrümmer) wurde verworfen.

2.2.2.2.2. Synthese von Proteinen im Kaninchen-Retikulozytenlysat

A) Behandlung von Retikulozytenlysat mit Nuklease

0,8ml Retikulozytenlysat wurden nach Zugabe von 25 μ l Häminlösung (1mM Hämin in 90% w/v Ethylenglycol; 2mM Tris/Cl pH 8,2; 5mM KCl) (Hunt und Jackson, 1974) durch Handwärme vorsichtig aufgetaut. Sofort nach dem Auftauen des Lysats und Abkühlen auf 0°C wurden 10 μ l 0,1M CaCl₂ und 10 μ l Nuklease aus Staphylococcus aureus (1mg/ml) zugegeben (Noll, 1974). Nach Inkubation für 15min bei 20°C wurde der Nukleaseverdau durch Zugabe von 50 μ l 0,1M EGTA-Lösung beendet und das nukleasebehandelte Retikulozytenlysat in Portionen von 110 μ l bis zur endgültigen Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

B) Markierung von Proteinen mit [35-S]Methionin

Zur Proteinsynthese in vitro (Pelham und Jackson, 1976) wurde ein Ansatz für 20 Translationsreaktionen mit je 12,5 μ l Volumen nach folgendem Schema im Eisbad zusammengestellt:

<u>VOLUMEN</u>	<u>STAMMLÖSUNG</u>		<u>ENDKONZENTRATION</u>
35 μ l	10mCi/ml [35 S]Methionin		1,4mCi/ml
10 μ l	2M KCl		80 mM
	10mM MgCl ₂		0,4mM
10 μ l	200mM Kreatinphosphat		8 mM
10 μ l	0,5-3mM alle l-Aminosäuren (ohne Methionin)		20-120 μ M
	10mM DTT		0,4mM
2,5 μ l	5mg/ml Kreatinkinase (50% v/v Glycerin)		50 μ g/ml
2,5 μ l	0,5M DTT		5 mM
50 μ l	ungefällter Transkriptionsmix		
oder 10 μ l	gefällter Transkriptionsmix		
+40 μ l	steriles Wasser		
100 μ l	nukleasebehandeltes Lysat		
220 μ l			

Zur Ermittlung des posttranslationalen Proteintransports wurden 30 μ l steriles Wasser, des cotranslationalen Proteintransports 20 μ l steriles Wasser und 10 μ l Hundepankreas-Mikrosomen zugefügt (Gesamtvolumen der Translationsreaktion: 250 μ l). Das Reaktionsgemisch wurde unter cotranslationalen Bedingungen für 30min, unter posttranslationalen Bedingungen für 10min bei 37°C inkubiert.

C) Markierung von Proteinen mit [35 S]Cystein

Die Synthesereaktion wurde wie bei der Markierung mit [35 S]Methionin durchgeführt, jedoch in Abwesenheit von unmarkierten Aminosäuren mit 45 μ l [35 S]Cystein (1100-1400Ci/mmol) anstelle von [35 S]Methionin.

D) Markierung von Proteinen mit [3-H]Leucin

Die Synthesereaktion wurde wie bei der Markierung mit [35 S]Methionin durchgeführt, jedoch in Abwesenheit von unmarkier-

ten Aminosäuren mit 45µl [³H]Leucin (100Ci/mmol) anstelle von [³⁵S]Methionin.

E) Synthese von unmarkierten Proteinen

Die Synthesereaktion wurde wie bei der Markierung mit [³⁵S]Methionin durchgeführt, jedoch in Anwesenheit von 35ul sterilem Wasser anstelle von [³⁵S]Methionin.

2.2.2.2.3. Präparation von "vorstufenfreiem" Kaninchen-Retikulo- zytenlysat

Ein Ansatz, wie für die Synthese von unmarkierten Proteinen benutzt, jedoch mit 50µl sterilem Wasser anstelle von Transkriptionsmix, wurde im Eisbad zusammengestellt und unmittelbar ohne Inkubation bei 37°C eingesetzt.

2.2.3. Transport von Vorstufenproteinen in Mikrosomen aus Hundepankreas

2.2.3.1. Isolierung von Mikrosomen aus Hundepankreas

Diese Vorschrift folgt mit geringen Abweichungen der von Watts et al. (1983) beschriebenen Methode:

Das einem Hund frisch entnommene Pankreas wurde mit Homogenisationspuffer (50mM TEA/Cl pH 7,5; 50mM KCl; 5mM MgCl₂; 0,25M Saccharose; 0,1% v/v β-Mercaptoethanol; 40µg/ml PMSF) bei 4°C gewaschen, von Bindegewebe, Fett und Blutgefäßen befreit und noch mehrmals mit Homogenisationspuffer gewaschen, bis die Waschflüssigkeit nur noch leicht rot angefärbt wurde. Der im Homogenisationspuffer in kleinere Stücke geschnittene Pankreas wurde dann durch eine Gewebepresse (Durchmesser der Sieblöcher 1mm) in 50ml vorgelegten, eiskalten Homogenisationspuffer gepreßt und durch fünf Durchgänge in einem elektrisch betriebenen 30ml Potter-Elvehjem-Homogenisator bei 1500Upm homogenisiert. Nach Zentrifu-

gation (12000xg, 10min, 4°C) wurde der Überstand (Homogenat) dekantiert und mit Homogenisationspuffer auf 100ml aufgefüllt, während das Sediment (Zell- und Gewebereste) verworfen wurde. Das Homogenat wurde einem diskontinuierlichen Dichtegradienten mit Stufen von 2,1M, 1,75M, 1,5M Saccharose in Homogenisationspuffer (je 4ml) überschichtet und zentrifugiert (Beckman Ti-70, 45000U_{pm}, 15Std., 4°C, ohne Bremse). Nach Absaugen des "rötlichbraunen" Überstandes unter leichtem Vakuum wurde die "gelblichweiße" Bande in der 1,75M Saccharoseschicht mit einer Pasteurpipette abgenommen und mit dem gleichen Volumen (~25ml) an Homogenisationspuffer verdünnt. Je 12,5ml der Mikrosomensuspension wurden auf 2ml 1,3M Saccharose in Homogenisationspuffer geschichtet und zentrifugiert (Beckman Ti-70, 40000U_{pm}, 60min, 4°C, ohne Bremse). Der Überstand wurde abgesaugt, die sedimentierten Mikrosomen in insgesamt 2ml 0,25M Saccharose, 20mM Hepes/KOH (pH 7,5), 50mM KCl, 1mM DTT aufgenommen und in einem 2ml Dounce-Homogenisator mit drei Durchgängen von Hand homogenisiert. Danach wurden 10µl der Mikrosomensuspension mit 2ml 2% (w/v) SDS verdünnt, die OD₂₆₀ bestimmt und die Suspension durch Zugabe von 0,25M Saccharoselösung auf eine OD₂₆₀ ~50/ml eingestellt. Nach Hinzufügen von 1/200 Vol. 0,2M CaCl₂ wurde die Suspension mit 40U/ml Nuklease aus Staphylococcus aureus (16000U/ml) versetzt und 10min bei 20°C inkubiert. Die Nukleasebehandlung wurde durch Zugabe von 1/100 Vol. 0,2M EGTA/KOH (pH 7,0) und Abkühlen auf 0°C beendet. Nachfolgend wurde durch Zugabe von 0,2M EDTA/KOH (pH 7,0) eine Konzentration von 5mM EDTA eingestellt. Nach Inkubation für 5min bei 0°C wurden mittels Zentrifugation (Beckman Ti-70, 40000U_{pm}, 60min, 4°C, ohne Bremse) durch ein 5ml Saccharosekissen (0,5M Saccharose; 20mM Hepes/KOH pH 7,5; 50mM KCl; 2mM MgAc; 1mM DTT) die dissoziierten Ribosomen

(im Überstand) von den Ribosomen freien Mikrosomen (im Sediment) getrennt. Der Überstand wurde abgesaugt, das Sediment in 1ml 0,2M Saccharoselösung (0,2M Saccharose; 20mM Hepes/KOH pH 7,5; 50mM KCl; 2mM MgAc; 1mM DTT) aufgenommen und in einem 2ml Dounce-Homogenisator in drei Durchgängen vorsichtig von Hand homogenisiert. Die Mikrosomensuspension wurde durch Zugabe von 0,2M Saccharoselösung auf eine OD₂₆₀ von 35 eingestellt, in Portionen von 50µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.3.2. Behandlung von Mikrosomen mit Trypsin

100µl Mikrosomensuspension (OD₂₆₀=35) wurden mit 0,5µl Trypsin (1mg/ml in H₂O) für 60min bei 0°C inkubiert. Der Proteaseverdau wurde durch Zugabe von 0,5µl Trypsininhibitor (aus Sojabohnen, 1mg/ml in H₂O) und 1µl PMSF (100mM in Isopropanol) mit anschließender Inkubation für 5min bei 0°C beendet. Portionen von 6µl wurden im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt (Zimmermann und Mollay, 1986).

Die Inaktivierung des Dockingproteins wurde durch Versuche kontrolliert, die folgende experimentelle Voraussetzungen bestätigten: i) Mit Trypsin behandelte Mikrosomen sind unfähig, im Kaninchen-Retikulozytenlysat die Vorstufe der leichten Kette des Immunglobulins zu prozessieren (Meyer et al., 1982). ii) Mit Trypsin behandelte Mikrosomen sind nach Rekonstitution mit Dockingprotein-Fragment (52kD) wieder in der Lage, im Kaninchen-Retikulozytenlysat den Vorläufer der leichten Kette des Immunglobulins zu prozessieren und die reife Form der leichten Kette zu sequestrieren (Meyer und Dobberstein, 1980).

2.2.3.3. Posttranslatiöner Transport von Proteinen

in Mikrosomen

Die Synthese in vitro von Vorstufenproteinen in Abwesenheit von Mikrosomen in einen Translationsansatz mit 12,5 µl Volumen wurde nach 10min Inkubation bei 37°C durch Zugabe von 0,75 µl Cycloheximid (2mg/ml in H₂O) und 0,75 µl RNase A (2mg/ml in H₂O, für 15min auf 100°C erhitzt) und anschließende Inkubation für 5min bei 37°C beendet. Der Ansatz wurde mit 3 µl Mikrosomen (OD₂₆₀=35) und 1 µl H₂O supplementiert. Die Transportreaktion (Gesamtvolumen 18 µl) wurde, falls nicht anders angegeben, für 15min bei 37°C durchgeführt.

2.2.3.4. Reisolierung von Mikrosomen durch Saccharosegradientenzentrifugation

2.2.3.4.1. Herstellung des Saccharosegradienten

36 µl einer posttranslationalen Transportreaktion wurden auf einen zweistufigen Saccharosegradienten geschichtet, der aus einer unteren Schicht von 50 µl 2M Saccharose in 50mM Hepes/KOH (pH 7,4), 50mM KAc, 2mM MgAc, 1mM DTT und einer darüberliegenden Schicht von 50 µl 0,5M Saccharose in gleichem Puffer bestand. Der Gradient wurde in einer Beckman "airfuge" mit Rotor A-100/30 für 5min bei 25psi zentrifugiert.

2.2.3.4.2. Fraktionierung des Saccharosegradienten

Der Gradient wurde von oben ausgehend in fünf Fraktionen zerlegt. Mit einer Eppendorfpipette wurde zunächst der rote Überstand (~40 µl, lösliche Proteine des Retikulozytenlysats) und daraufhin die leicht rötlich gefärbte erste Saccharoseschicht (~40 µl) abgenommen. Es folgte eine gelblich-grau gefärbte Zwischenphase (~5 µl, Mikrosomen) zwischen der ersten und zweiten Saccharose-

schicht, sodann die klare zweite Saccharoseschicht (~50µl), die ebenso wie die erste Saccharoseschicht verworfen wurde und schließlich ein hyalines Sediment (Ribosomen). Unter diesen Bedingungen betrug die Menge an Vorstufenprotein in den abgenommenen Fraktionen Überstand, Zwischenphase und Sediment ungefähr 80-90% der auf den Saccharosegradienten aufgetragenen Gesamtmenge an Vorstufenprotein.

2.2.3.5. Behandlung von Mikrosomen mit Proteinase K

Zum Nachweis der Sequestrierung der reifen Form von Vorstufenproteinen durch Mikrosomen aus Hundepankreas wurden 12,5µl einer cotranslationalen Transportreaktion bzw. 18µl einer posttranslationalen Transportreaktion mit 6µl bzw. 10,5µl 0,25M Saccharose (in H₂O) und - falls nicht anders angegeben - mit 1,5µl Proteinase K (1mg/ml in H₂O) oder, im Falle der Kontrollbehandlung, ohne Proteinase K mit 1,5µl H₂O supplementiert. Die Inkubation für 60min bei 0°C wurde in Anwesenheit oder Abwesenheit von 1µl bzw. 1,5µl Triton X-100 (20%) durchgeführt. Der Verdau wurde durch Zugabe von 2,5µl bzw. 4µl PMSF (100mM in Isopropanol) und Inkubation für 5min bei 0°C beendet.

2.2.4. Analytische Techniken

2.2.4.1. HPLC-Analyse

Mit Trypsin verdaute oder unverdaute Proteine wurden durch "reverse phase" HPLC mit einer uBondapak Phenyl-Säule (3,9mm x 30cm, 10µm Partikelgröße) analysiert (Yuan et al., 1982). Die Säule wurde bei einer Flußrate von 0,8ml/min mit Lösungsmittel A (0,1% v/v CF₃CO₂H) äquilibriert. Nach Injektion der Probe wurden die Peptide bzw. Proteine für 20min mit Lösungsmittel A gewaschen und nachfolgend mit einem linearen Gradienten von 0-50% (v/v)

Lösungsmittel B (0,1% $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$; 9,9% H_2O ; 90% CH_3CN ; v/v/v)(Nicholson et al., 1987) eluiert. 47 Fraktionen wurden in 2min Intervallen gesammelt und einer Radioaktivitätsbestimmung unterzogen. Dazu wurden die Proben (1,6ml) mit 4ml 1% w/v SDS, 100mM Tris/Cl (pH 8,0) und 12ml Szintillationscocktail ACSII versetzt und in einem Flüssigszintillationszähler gezählt. Die gesamte Laufzeit einschließlich der Äquilibration der Säule betrug 105min. Alle HPLC-Läufe wurden bei konstanter Flußrate von 0,8ml/min und bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.4.2. Fraktionierung von Proteingemischen mit Butanol

Zur Entfernung von Globin aus Ansätzen mit im Retikulozytenlysat synthetisiertem Prepromelittin wurde die entsprechende Probe mit H_2O auf 100 μl aufgefüllt, mit 50 μl 0,25% (v/v) NH_4 und 150 μl 1-Butanol versetzt und kräftig gemischt (Vortex-Mixer)(Suchanek und Kreil, 1977; Suchanek et al., 1978). Nach 30min Inkubation bei Raumtemperatur wurde in einer Eppendorffzentrifuge für 2min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Butanolphase wurde abgenommen und verworfen. Zur Zwischenphase und zur unteren wäßrigen Phase wurden 150 μl 1-Butanol hinzugefügt. Nach erneutem kräftigen Mischen, 5min Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation unter obigen Bedingungen wurde die Butanolphase abgenommen und verworfen, die Zwischenphase und wäßrige Phase mit 100 μl Methanol versetzt. Das Gemisch wurde 2min bei Raumtemperatur in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand (wäßrige Phase) wurde in neue Eppendorfcups überführt und, ebenso wie das Sediment (Zwischenphase), unter Vakuum 2-3Std. getrocknet ("speed vac" Zentrifuge) und nachfolgend in 50 μl 1xLaemmli-Puffer gelöst. Unter diesen Bedingungen fanden sich ~80% des im Retikulozytenlysat enthaltenen Globins und ~75% des synthetisierten Prepromelittins in der Zwischenphase wieder, während Promelittin fast

quantitativ, zusammen mit dem Rest an Globin und Prepromelittin in die wäßrige Phase fraktionierte.

2.2.4.3. Fällung von Proteingemischen mit Ammoniumsulfat

Zur Entfernung von Globin aus Ansätzen mit im Retikulozytenlysat synthetisierten Hybridproteinen mit Molekulargewicht <20kD wurde die Probe (Volumen mindestens 25µl, andernfalls mit H₂O aufgefüllt) mit dem zweifachen Volumen an eiskalter gesättigter Ammoniumsulfatlösung (pH 7,4) versetzt, kräftig gemischt und 1Std. bei 0°C inkubiert (Hoover et al., 1982). Nach Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge, 15min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und verworfen, der Niederschlag mit 1ml 5% (w/v) TCA versetzt. Nach kurzem Schütteln wurde erneut, wie oben, zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Der Niederschlag wurde noch zweimal mit je 1ml kaltem Aceton in gleicher Weise gewaschen, anschließend unter Wasserstrahlvakuum 30min lang getrocknet und in 50µl 1xLaemmli-Puffer gelöst.

2.2.4.4. Fällung von Proteinen mit Antikörpern

Die Probe mit im Retikulozytenlysat synthetisierten Proteinen (12,5-50µl) wurde durch Zugabe von SDS-Lösung (20% w/v) auf eine SDS-Konzentration von 2% (w/v) eingestellt und für 5min auf 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge, 2min, Raumtemperatur) wurde der Überstand in neue Eppendorfcups überführt, durch Zugabe von 1ml TEST-Puffer (2% v/v Triton X-100; 0,1mM EDTA; 150mM NaCl; 10mM Tris/Cl pH 8,1) verdünnt und mit 10µl Anti-Melittin-Antiserum bzw. 2,5µl Anti-DHFR-Antiserum versetzt. Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden 50µl Protein A-Sepharose (10% w/v Protein A-Sepharose Cl-4B in TES-Puffer s.u., für 60min vorgequollen) zugegeben und die Inkubation für 60min bei 4°C unter Schütteln (Eppendorff-Schüttler) fortgesetzt. Anschließend

wurde die Probe 2min in der Eppendorffzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde der Niederschlag in 1ml TEST-Puffer suspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Vakuum abgesaugt, während die sedimentierte Protein A-Sepharose in 1ml TES-Puffer (10mM Tris/Cl pH 8,1; 150mM NaCl; 0,1mM EDTA) aufgenommen wurde. Nach Zentrifugation und sorgfältigem Entfernen des Überstands wurde der Niederschlag mit 50µl 1xLaemmli-Puffer versetzt, kräftig geschüttelt (Vortex-Mixer) und für 5min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde die Probe in der Eppendorffzentrifuge für 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfcups überführt, während der Niederschlag (Protein A-Sepharose) verworfen wurde.

2.2.4.5. Diskontinuierliche SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgелеlektrophorese

Es wurde eine vertikale Polyacrylamidgелеlektrophorese mit 19% (w/v) Trenngel bei 0,08% (w/v) Quervernetzung und 5% (w/v) Sammelgel bei 0,13% (w/v) Quervernetzung in Gegenwart von 6M Harnstoff und 0,1% (w/v) SDS durchgeführt (Ito et al., 1980).

2.2.4.5.1. Herstellung der Gele

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten (35x25cm), die mit Hilfe von seitlich eingeklemmten Abstandshaltern auf 0,75-1mm Abstand gebracht waren, nach folgendem Schema gegossen:

	20% Bodengel	19% Trenngel	5% Sammelgel
60% w/v Acrylamid (AA)	-	24,0ml	-
30% w/v Acrylamid	-	-	3,34ml
30% w/v AA; 0,2% w/v BAA	26,8ml	-	-
1% w/v Bisacrylamid (BAA)	-	5,5ml	2,60ml
1,875M Tris/Cl pH 8,85	8,0ml	-	-
1,0 M Tris/Cl pH 8,725	-	25,0ml	-
1,0 M Tris/Cl pH 6,8	-	-	1,25ml
Harnstoff	-	27 g	7,2g
H ₂ O (bidest.)	4,4ml	-	7,36ml
10% w/v SDS	400µl	750µl	200µl
TEMED	100µl	25µl	10µl
10% w/v AMPS	200µl	250µl	100µl
Gesamtvolumen	40,0ml	75,0ml	20,0 ml

Zum Gießen wurden die Glasplatten in einen Trog gestellt. Es wurde zunächst ein Bodengel (20% Acrylamid) gegossen. Nach dessen Polymerisation wurde das Trenngel (19% Acrylamid) eingefüllt. Das noch nicht polymerisierte Trenngel wurde mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, welches nach Polymerisation des Trenngels vor dem Gießen des Sammelgels (5%) wieder sorgfältig entfernt wurde. In das Sammelgel wurde ein die späteren Auftragsspalten formender Kamm eingesetzt. Zur Verwendung kam entweder ein Kamm mit 19 Zähnen für ein max. Probenvolumen von 200µl oder ein Kamm mit 32 Zähnen für ein max. Probenvolumen von 75µl. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden Kamm und Bodentrog entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt oder bis zur Verwendung max. eine Woche lang unter hoher Luftfeuchtigkeit bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.4.5.2. Präparation der Proben und Durchführung der

Elektrophorese

Für die in Anwesenheit von Reduktionsmittel durchgeführte Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proben mit Mercaptoethanol enthaltendem Laemmli-Puffer, für die in Abwesenheit von Reduktionsmittel durchgeführte Elektrophorese mit Laemmli-Puffer ohne Mercaptoethanol versetzt, sodaß in den Proben eine Endkonzentration von 2% w/v SDS, 10% v/v Glycerin, 60mM Tris/Cl (pH 6,8), 0,01% w/v Bromphenolblau und fallweise zusätzlich von 5% v/v β -Mercaptoethanol vorlag (Laemmli, 1970). Die Proben wurden für 5min auf 95°C erhitzt und unmittelbar vor dem Gelauftrag in der Eppendorffzentrifuge für 2min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Hamilton-Spritze (100 μ l) in die Geltaschen gefüllt. Als Elektrophoresekammer diente ein System, das aus zwei übereinander angeordneten Elektrodenkammern bestand, die durch das vertikal eingespannte Gel während der Elektrophorese verbunden wurden. Als Elektrodenpuffer diente eine Lösung von 14,4g/l Glycin, 3,03g/l Tris, 1g/l SDS. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke von ~20mA solange betrieben, bis die Bromphenolblau-Front in das Bodengel eingedrungen war (~16-18Std.).

2.2.4.5.3. Fluorographie

Das Gel wurde zunächst in einer Fixierlösung (10% v/v Essigsäure; 40% v/v Methanol; 2% v/v Glycerin) für 30min, dann in einer Neutralisationslösung (50% v/v Methanol; 1% v/v Glycerin) für 60min und zuletzt in Salicylatlösung (1M Salicylsäure/NaOH pH 7,0; 30% v/v Methanol; 1% v/v Glycerin) (Chamberlain, 1979) für 75min jeweils bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Gel wurde anschließend auf Filterpapier gelegt, auf einem Vakuum-Geltrock-

ner bei 80°C für ungefähr 3-4Std. getrocknet und sodann einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR) unterlegt. Die Expositionszeit bei -80°C betrug im Regelfall 12-48Std.. Der Film wurde in einer automatischen Entwicklungsmaschine Gevomatic 60 entwickelt.

2.2.4.5.4. Densitometrie

Die densitometrische Auswertung der Autoradiogramme erfolgte mit einem UltrascanXL Laserdensitometer unter Berücksichtigung einer Dimension (Dicke) oder, falls erforderlich, beider Dimensionen (Dicke und Breite) der Banden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Verhalten von Prepromelittin der Honigbiene und Dihydrofolatreduktase der Maus in Gegenwart von Hundepankreas-Mikrosomen

Zu Beginn der Untersuchungen war zu klären, ob plasmidabhängig synthetisiertes Prepromelittin der Honigbiene bzw. Dihydrofolatreduktase der Maus das für sekretorische bzw. cytosolische Proteine erwartete Verhalten im in vitro Transportsystem zeigen. Der Transport von Prepromelittin in Hundepankreas-Mikrosomen nach in vitro Translation der aus der Giftdrüse der Honigbiene isolierten RNS war bereits beschrieben (Zimmermann und Molloy, 1986). Dieser sollte mit dem Transport von Prepromelittin nach in vitro Transkription und Translation des für Prepromelittin kodierenden Plasmids verglichen werden.

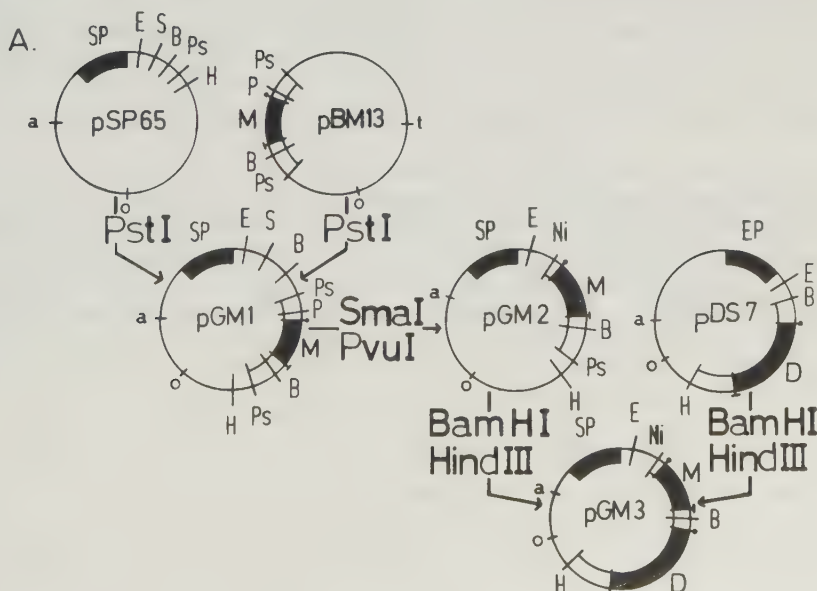
Die für Prepromelittin der Honigbiene und die für Dihydrofolatreduktase der Maus kodierende cDNS wurden in den Polylinker von Plasmid pSP65 kloniert. Dieses besitzt einen vor dem Polylinker gelegenen SP6-Promoter zur in vitro Transkription mit SP6 RNS-Polymerase (Abb. 1A, pGM1). Die GC-reiche Region der für Prepromelittin kodierenden cDNS zwischen der PstI-Schnittstelle und dem Startkodon von Prepromelittin wurde als SmaI/PvuII-Restriktionsfragment entfernt (Abb. 1A, pGM2). Dies führte zu einer etwa 20fachen Erhöhung der Effizienz der Synthese von Prepromelittin nach in vitro Transkription/Translation von Plasmid pGM2 im Vergleich zu Plasmid pGM1 (Daten nicht gezeigt).

Die in vitro Transkription des für Prepromelittin kodierenden Plasmids mit SP6 RNS-Polymerase und anschließende in vitro Translation im Kaninchen-Retikulozytenlysat führten zu einem Protein, das etwa 90% der Radioaktivität aller markierten Produkte

Abb. 1: Konstruktion des Plasmids zur *in vitro* Transkription der für Prepromelittin der Honigbiene kodierenden cDNS

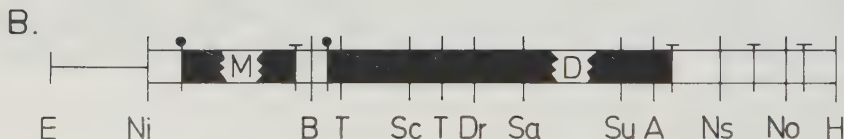
Die cDNS, kodierend für Prepromelittin, wurde aus Plasmid pBM13 (Vlasak et al., 1983) als PstI-Fragment ausgeschnitten und in die durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierte PstI-Schnittstelle des Polylinkers von Plasmid pSP65 (Krieg und Melton, 1984) eingefügt. Transformierte Bakterien wurden auf Klone hin untersucht, welche Plasmide mit der für Prepromelittin kodierenden cDNS in der richtigen Orientierung zum am 5'-Ende der cDNS liegenden SP6 Transkriptions-Promoter enthalten (pGM1). Der 5'-Bereich der cDNS ohne Kodierungsfunktion wurde aus diesem Plasmid entfernt: Dazu wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen SmaI und PvuI geschnitten. Das größere der beiden entstehenden Fragmente wurde aus einem Agarosegel isoliert. Das überhängende 5'-Ende des Fragments wurde durch Behandlung mit Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I aufgefüllt und das nunmehr stumpfendige, über ein Agarosegel gereinigte Fragment wurde durch nachfolgende Ligation in Gegenwart von T4 DNS-Ligase zum zirkulären Plasmid (pGM2) geschlossen. Die cDNS, kodierend für das Enzym Dihydrofolatreduktase der Maus, wurde aus Plasmid pDS7 (Hurt et al., 1984) als BamHI/HindIII-Fragment ausgeschnitten, durch Agarosegelelektrophorese gereinigt und in das Plasmid pGM2, welches mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und mit alkalischer Phosphatase behandelt worden war, durch Inkubation mit T4 DNS-Ligase eingefügt. Das so entstandene Plasmid pGM3 diente als Ausgangsvektor für alle nachfolgenden Konstruktionen von Hybridgenen zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase, sowie für die Konstruktion der verkürzten Versionen von diesen Genen.

A) Schematische Darstellung der Konstruktion



SP, SP6 Promoter; EP, E.coli Promoter; a, Resistenz gegen Ampicillin; t, Resistenz gegen Tetracyclin; o, Ursprung der Replikation; M, cDNS kodierend für Prepromelittin der Honigbiene; D, cDNS kodierend für Dihydrofolatreduktase der Maus; A, AccI; B, BamHI; Dr, DraI; E, EcoRI; H, HindIII; Ni, NciI; No, NcoI; Ns, NsiI; Ps, PstI; P, PvuI; Sa, SacI; Su, Sau96I; Sc, ScaI; S, SmaI; T, TaqI; ↑, Startkodon; T, Stopkodon; einfache Linien in den "pGM"-Plasmiden repräsentieren DNS-Sequenzen, die von Plasmid pSP65 abgeleitet sind; offene Balken symbolisieren nicht-kodierende Sequenzen, geschlossene Balken kodierende Sequenzen.

B) Restriktionskarte der kodierenden und nicht-kodierenden Bereiche aus der cDNS für Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase im Plasmid pGM3



M, cDNS kodierend für Prepromelittin der Honigbiene; D, cDNS kodierend für Dihydrofolatreduktase der Maus; A, AccI; B, BamHI; Dr, DraI; E, EcoRI; H, HindIII; Ni, NciI; No, NcoI; Ns, NsiI; Ps, PstI; P, PvuI; Sa, SacI; Su, Sau96I; Sc, ScaI; S, SmaI; T, TaqI; ↑, Startkodon; T, Stopkodon; einfache Linien in den "pGM"-Plasmiden repräsentieren DNS-Sequenzen, die von Plasmid pSP65 abgeleitet sind; offene Balken symbolisieren nicht-kodierende Sequenzen, geschlossene Balken kodierende Sequenzen.

vereinte und durch Anti-Melittin-Antikörper fällbar waren (Abb. 2A; Spur 1). Die Anwesenheit von Mikrosomen aus Hundepankreas während der Synthese von Prepromelittin verursachte das Auftreten eines zusätzlichen, mit Anti-Melittin-Antikörper fällbaren Proteins mit geringerem Molekulargewicht als Prepromelittin (Abb. 2A; Spur 3). Dieses Protein war resistent gegen Proteinase K, die nach Synthese zugefügt worden war (Abb. 2A; Spur 4). Das größere Protein wurde durch Protease verdaut. Offensichtlich wurde Prepromelittin von Mikrosomen durch Abtrennung des Signalpeptids in Promelittin überführt, d.h. prozessiert und in das Lumen der mikrosomalen Vesikel transportiert, d.h. sequestriert. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Sequestrierung von Dockingprotein abhängt.

Inaktivierung des Dockingproteins durch proteolytische Abspaltung der cytoplasmatischen Domäne (MW=52kD) der α -Unterheit mit Trypsin (Meyer and Dobberstein, 1980) verhinderte die Prozessierung der Vorstufe und Sequestrierung der reifen Form des Dockingprotein-abhängigen sekretorischen Proteins Laktogen des Menschen (Daten nicht gezeigt) durch Mikrosomen. Im Falle von Prepromelittin hatte die Inaktivierung von Dockingprotein jedoch keinen Einfluß auf die von der Mikrosomenmenge abhängige Prozessierung (Abb. 2A; Spuren 5 und 7). Das entstandene Promelittin war jedoch nicht vor Verdau durch Proteinase K geschützt (Abb. 2A; Spuren 6 und 8), wurde also von Trypsin behandelten Mikrosomen nicht sequestriert.

Dies bedeutet, daß die Insertion von Prepromelittin in die mikrosomale Membran als Voraussetzung für die nachfolgende Prozessierung durch die Signalpeptidase im Inneren der mikrosomalen Vesikel unabhängig von Dockingprotein erfolgen kann. Dagegen erforderte der Membrantransfer des inserierten Promelittins

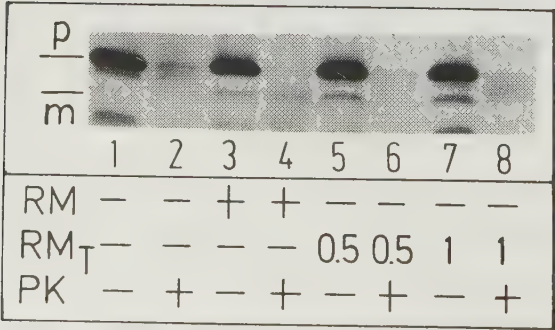
Abb. 2: Identität und Transportverhalten des plasmidkodierten Prepromelittins der Honigbiene und der plasmidkodierten Dihydrofolatreduktase der Maus

A) Prepromelittin wurde nach in vitro Transkription des Plasmids pGM3 mit SP6 RNS-Polymerase für 45min bei 40°C im Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von [³H]Leucin synthetisiert. Die in vitro Translation bei 37°C erfolgte in Abwesenheit von Membranen (Spuren 1 und 2), in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 3 und 4) und in Anwesenheit von 0,5µl (Spuren 5 und 6) oder 1µl (Spuren 7 und 8) Hundepankreas-Mikrosomen, die mit Trypsin vorbehandelt worden waren. Nach 30min wurden die Reaktionsmischungen in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot diente als Kontrolle und wurde in Abwesenheit von Proteinase K inkubiert (Spuren 1, 3, 5 und 7). Das andere Aliquot wurde in Gegenwart von Proteinase K inkubiert (Spuren 2, 4, 6 und 8). Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben auf 1mM PMSF eingestellt und die Inkubation für 5min bei 0°C fortgesetzt. Sodann folgte eine Immunpräzipitation mit Antikörper gegen Prepromelittin. Die Immunpräzipitate wurden in Probenpuffer aufgenommen und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

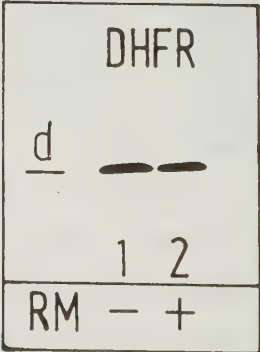
B) Dihydrofolatreduktase der Maus wurde nach in vitro Transkription des entsprechenden Plasmids in einem [³⁵S]Methionin enthaltenden Kaninchen-Retikulozytenlysat für 30min bei 37°C in Abwesenheit von Mikrosomen (Spur 1) oder in Anwesenheit von Mikrosomen (Spur 2) synthetisiert. Das für die Dihydrofolatreduktase der Maus kodierende Plasmid bestand aus dem Vektor pSP65, in dessen Polylinker das die cDNS der Dihydrofolatreduktase enthaltende BamHI/HindIII-Fragment aus Plasmid pDS7 kloniert worden war. Nach der Translation wurden die Proben unmittelbar ohne Proteasebehandlung einer Immunpräzipitation mit Antikörper gegen die Dihydrofolatreduktase unterworfen.

p, Vorstufe; m, reife Form; d, Dihydrofolatreduktase; RM, Mikrosomen; RM_T, mit Trypsin vorbehandelte Mikrosomen; PK, Proteinase K.

A)



B)



in das Lumen der mikrosomalen Vesikel eine proteasesensitive Komponente auf der Außenseite der Mikrosomen. Dieses Transportverhalten von Prepromelittin wurde auch nach in vitro Translation von aus der Giftdrüse der Honigbiene isolierter .RNS beobachtet (Zimmermann und Molloy, 1986). Es ist damit unabhängig von den Synthesebedingungen.

Die plasmidgesteuerte in vitro Synthese der Dihydrofolatreduktase der Maus führte in Abwesenheit (Abb. 2B; Spur 1), wie auch in Anwesenheit (Abb. 2B; Spur 2) von Hundepankreas-Mikrosomen nur zu einem Protein, welches durch Anti-Dihydrofolatreduktase-Antikörper gefällt wurde. Dieses cytosolische Protein wurde, wie erwartet, von Mikrosomen nicht prozessiert, war also nicht in der Lage in die mikrosomale Membran zu inserieren. Da die Dihydrofolatreduktase der Maus außerdem keine mit dem Transport über biologische Membranen unvereinbaren Strukturmerkmale besitzt, wie durch ihren Transport in Hefemitochondrien nach Anfügen einer mitochondriale Präsequenz gezeigt werden konnte (Hurt et al., 1984 und 1985), wurde sie als "Passagier-Protein" für die Konstruktion von Hybridproteinen mit Prepromelittin der Honigbiene verwendet.

3.2. Strukturelle Voraussetzungen für die SRP/Dockingprotein-Unabhängigkeit des Transports von Prepromelittin

Die Fähigkeit von Prepromelittin, das SRP/Dockingprotein-System umgehen zu können, muß in der Struktur dieses Vorstufenproteins begründet sein. In Hybridproteinen wurden deshalb systematisch charakteristische Strukturmerkmale von Prepromelittin verändert (Abb. 4). Der Transport von strukturellen Varianten von Prepromelittin, die in einem oder mehreren dieser Merkmale verändert waren, in Mikrosomen aus Hundepankreas, welche mit Trypsin

vorbehandelt worden waren, wurde untersucht. Dadurch sollten die strukturellen Voraussetzungen von Prepromelittin für die Unabhängigkeit des Transports von SRP und Dockingprotein und die Abhängigkeit von der proteasesensitiven Komponente geklärt werden. Darüberhinaus ging es dabei auch um die Frage, bei welchen anderen Vorstufenproteinen dieses Transportverhalten anzutreffen ist und welche strukturellen Bedingungen sie dafür erfüllen müssen.

3.2.1. Konstruktion von Hybridproteinen zwischen Prepromelittin der Honigbiene und Dihydrofolatreduktase der Maus

Zunächst wurden Fusionen von Dihydrofolatreduktase mit aminoterminalen Anteilen Prepromelittins hergestellt. Die für Dihydrofolatreduktase kodierende cDNS wurde in das Plasmid pGM2 hinter die für Prepromelittin kodierende cDNS kloniert (Abb. 1A; pGM3). Die Fusion der für das vollständige Prepromelittin oder für aminoterminalen Bereiche von Prepromelittin kodierenden cDNS mit der für Dihydrofolatreduktase kodierenden cDNS wurde durch exonukleolytischen Verdau des mit Restriktionsenzym BamHI linearisierten Plasmids pGM3 und anschließende Ligierung erreicht. Die Entfernung von Aminosäuren im carboxyterminalen Bereich der resultierenden Hybridproteine wurde durch Entfernung von geeigneten Restriktionsfragmenten aus der 3'-kodierenden Region der cDNS der Dihydrofolatreduktase erreicht. Die Einführung von Aminosäuren im carboxyterminalen Bereich wurde durch Einfügen von Oligonukleotiden in Restriktionsschnittstellen nahe dem vom jeweiligen Hybridprotein benutzten Stopkodon im 3'-nicht-kodierenden Bereich der cDNS der Dihydrofolatreduktase bewerkstelligt (Abb. 3). Die Veränderungen der cDNS durch Sequenzierung der betroffenen Region mittels der Kettenabbruchsmethode kontrolliert (Abb. 4).

Abb. 3: Konstruktion von Plasmiden, die für Hybridproteine zwischen Prepromelittin der Honigbiene und Dihydrofolatreduktase der Maus kodieren

Zur Fusion der für Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase kodierenden cDNS wurde das Plasmid pGM3 an seiner einzigen BamHI-Schnittstelle geöffnet (s. Abb. 1A und 1B) und unter kontrollierten Bedingungen mit der Nuklease Bal31 verdaut. Die Vektoren, eine heterogene Population aus linearisierten, verkürzten Molekülen, wurden im Polyacrylamidgel der Größe entsprechend aufgetrennt. Vektoren im gewünschten Molekulargewichtsbereich wurden aus dem Gel isoliert und ihre Enden mit Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase I aufgefüllt. Die nachfolgende Ligation der DNS führte zu Plasmiden mit unterschiedlich langer Hybrid-cDNS zwischen 3'-verkürzten Versionen der für Prepromelittin kodierenden cDNS und 5'-verkürzten Versionen der für die Dihydrofolatreduktase kodierenden cDNS. Alternativ wurde vor der Ligation die teilweise angedaute, für eine carboxyterminal verkürzte Dihydrofolatreduktase kodierende cDNS durch Schneiden der Plasmide mit HindIII entfernt. Das größere der beiden Fragmente wurde aus einem Agarosegel isoliert, durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert und mit einer für eine vollständige Dihydrofolatreduktase kodierenden cDNS ligiert. Diese cDNS wurde aus Plasmid pDS7 durch Schneiden mit BamHI, Auffüllreaktion mit Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase I, Nachschneiden mit HindIII und Reinigung des kleineren der beiden entstandenen Fragmente über ein Agarosegel gewonnen. Diese Klonierung führte zu Plasmiden mit verschieden großer Hybrid-cDNS zwischen 3'-verkürzten Versionen der für Prepromelittin kodierenden cDNS und der vollständigen, für die Dihydrofolatreduktase kodierenden cDNS.

Zur Verkürzung der Hybridgene zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase an ihrem 3'-kodierenden Ende wurden geeignete Restriktionsfragmente aus dem 3'-Bereich der für die Dihydrofolatreduktase kodierenden cDNS entfernt. Konnte die zu deletierende Region der cDNS durch Restriktionsenzyme ausgeschnitten werden, die nur eine einzige Erkennungsstelle auf dem jeweiligen Plasmid besaßen, wurden die entsprechenden großen Vektorfragmente aus Agarosegelen isoliert und mit sich selbst ligiert. Zuvor jedoch waren die Vektoren durch eine Behandlung mit Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I, T4 DNS-Polymerase oder S1 Nuklease oder durch eine sequentielle Kombination von mehreren dieser Behandlungen zu Molekülen mit definiertem, stumpfen 3'-Ende aufgefüllt oder abgedaut worden. Damit stimmte nach erfolgter Selbst-Ligation der Vektoren der Leserahmen des verbleibenden Hybridgens mit dem authentischen Stopkodon der für die DHFR kodierenden cDNS (im Falle der für die Hybridproteine pp Δ DHFR/3* und pp Δ DHFR/2* kodierenden Hybridgene) oder mit dem nächsten, auf die NsiI- bzw. NcoI-Schnittstelle folgenden Stopkodon in der 3'-nicht-kodierenden Region der für die DHFR kodierenden cDNS (in allen anderen Fällen) überein. Besaß das gewünschte Restriktionsenzym mehr als eine Schnittstelle auf dem Plasmid, wurde ein Fragment der cDNS, kodierend für das 3'-verkürzte Hybridgen, durch Schneiden des vollständigen Hybridgens mit dem entsprechenden Restriktionsenzym DraI, SacI, ScaI oder TaqI in seinem kodierenden Bereich und nachfolgend mit EcoRI in seinem 5'-nicht-kodierenden Bereich hergestellt. Dieses Fragment wurde über Agarose- oder Polyacrylamidgele gereinigt und mit einem Vektor

ligiert, welcher aus Plasmid pGM3 durch Schneiden mit AccI, NcoI, NsiI oder Sau96I und nachfolgend mit EcoRI, Dephosphorylierung und Reinigung über ein Agarosegel hervorgegangen war. Vor dem zweiten Schnitt mit EcoRI wurden die durch die erste Restriktion entstandenen Enden der DNS der beiden zu ligierenden Fragmente durch enzymatische Auffüll- und/oder Abbaureaktionen mit Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I, T4 DNS-Polymerase und Nuklease SI entsprechend der direkten Ligation verändert.

Zur Einführung von zwei komplementären, synthetisch hergestellten Oligonukleotiden: d(3'AATGCTGCTGCTGCTATT5') und

d(5'TTACGACGACGACGATAA3'), welche in einem

Leserahmen - je nach Orientierung - für vier Argininreste bzw. vier Serinreste und ein Stopkodon und in einem anderen Leserahmen für vier Threoninreste und ein Isoleucin kodieren, wurden Plasmide mit den verkürzten Formen der verschiedenen Hybridgene zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase benutzt. Diese Plasmide wurden entweder an Schnittstellen unmittelbar vor dem Stopkodon des verkürzten Hybridproteins (TaqI oder HindIII; letztere Schnittstelle ist durch Entfernung des TaqI/ HindIII-Fragments aus der für das Hybridprotein ppm_Δ-DHFR/1 kodierenden cDNS während der Klonierung des Hybridgens für ppm_Δ-DHFR/3 neu geschaffen worden) oder an Schnittstellen nach diesem Stopkodon (NcoI) geöffnet. Im letzteren Fall wurde das Stopkodon durch begrenzten und über Polyacrylamidgelelektrophorese kontrollierten Abbau mit Nuklease Bal31 entfernt. Die aus den Agarosegelen isolierten, linearisierten Plasmide wurden durch Behandlung mit Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I, T4 DNS-Polymerase oder Nuklease SI oder einer Kombination von diesen Enzymen zu Molekülen mit definierten, stumpfen Enden aufgefüllt oder abgedaut. Damit stimmte nach Ligation der dephosphorylierten Plasmide mit einem Überschuß an über ein Polyacrylamidgel gereinigten, durch T4 Polynukleotidkinase phosphorylierten und durch Vorinkubation miteinander gepaarten Oligonukleotiden, der Leserahmen der verkürzten Hybridgene mit dem Leserahmen der Oligonukleotide, kodierend für Serinreste bzw. Argininreste mit anschließendem Stopkodon oder mit dem Leserahmen, kodierend für vier Threoninreste mit anschließendem Isoleucin überein. Im letzteren Fall mußte, anstelle des vom Oligonukleotid kodierten Stopkodons, das nächste, auf die NcoI-Schnittstelle im nicht-kodierenden Bereich der für die DHFR kodierenden cDNS folgende Stopkodon benutzt werden. Dies verursachte die Einführung von Kodons für die Aminosäuren Serin, Tryptophan und Leucin. Alternativ wurden die 3'-Enden verkürzter Hybridgene gegen die 3'-Enden anderer verkürzter Hybridgene, in die nach obiger Methode bereits Oligonukleotide eingeführt worden waren, ausgetauscht. Dazu wurden TaqI/HindIII-Fragmente von verkürzten Hybridgenen mit eingeführten Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgelen isoliert. Plasmide, deren Hybridgene zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase sich nur im 5'-kodierenden Bereich bis hin zur TaqI-Schnittstelle von denen mit bereits inserierten Oligonukleotiden unterschieden, wurden einem teilweisen Restriktionsverdau mit TaqI unter kontrollierten Bedingungen unterzogen. Aus einem Agarosegel wurden linearisierte Plasmide voller Länge, die durch TaqI nur einmal geschnitten worden waren, isoliert und mit HindIII nachverdaut. Das bei diesem "Nach"-Verdau entstandene größte Fragment entsprach einem Vektor mit ausschließlich deletiertem TaqI/HindIII-Fragment des 3'-kodierenden Bereichs des verkürzten Hybridgens zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatre-

duktase. Es wurde nach Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase über ein Polyacrylamidgel gereinigt und mit den kleinen TaqI/HindIII-Fragmenten der Hybridgene mit bereits eingeführten Oligonukleotiden ligiert.

Die Produkte der entsprechenden Klonierungen wurden auf richtigen Leserahmen der für die DHFR kodierenden cDNS bei den Hybridgenen, auf Besitzen des richtigen Stopkodons bei den verkürzten Hybridgenen, sowie auf Orientierung und Leserahmen der inserierten Oligonukleotide bei den verkürzten Hybridgenen hin untersucht. Dazu dienten i) Restriktions- und Sequenzanalyse der Hybridgene und ii) Analyse ihrer in vitro Transkriptions/Translationsprodukte auf apparentes Molekulargewicht und - falls möglich - auf Fällbarkeit durch Antikörper gegen die Dihydrofolatreduktase der Maus.

Die Namen der Proteine beziehen sich auf Abb. 4; der Pfeil innerhalb der Klammern zeigt in die Richtung des Verbaus der cDNA mit Bal31 von der jeweiligen Restriktionsschnittstelle ausgehend zur EcoRI-Schnittstelle hin (Pfeil nach links) oder von ihr weg (Pfeil nach rechts); die Pfeilspitze ist auf die angebaute cDNS gerichtet (ppm, cDNS kodierend für Prepromelittin; DHFR, cDNS kodierend für Dihydrofolatreduktase; p, cDNS kodierend für das entsprechende Hybridprotein); die Nummer innerhalb der Pfeile gibt die Zahl der abgedauten Nukleotide an, ausgehend von der BamHI- bzw. NcoI-Schnittstelle; (-) symbolisiert das Entfernen eines Restriktionsfragments, (+) das Einfügen eines Restriktionsfragments oder zweier komplementärer Oligonukleotide, kodierend für vier Argininreste, vier Serinreste oder vier Threoninreste.

Protein	Klonierungsstrategie		
	Fusion	Verkürzung	Insertion von Nukleotiden
ppm-DHFR/1	Bam HI/Bal31 (ppm<--6--)	--	--
ppm-DHFR/2		-ScaI/NotI	--
ppm-DHFR/3		-TaqI/NotI	--
ppm _Δ -DHFR/1	Bam HI/Bal31 (ppm<--33--)	--	--
ppm _Δ -DHFR/2		-ScaI/NcoI	--
ppm _Δ -DHFR/3		-TaqI/NcoI	--
ppm _Δ -DHFR/3Arg			HindIII
ppm _Δ -DHFR/3Ser			+Oligo Arg HindIII +Oligo Ser
pp _Δ -DHFR/	Bam HI/Bal31 (ppm<--67--) (--170-->DHFR)	--	--
pp _Δ -DHFR/2		-ScaI/NcoI	--
pp _Δ -DHFR/3		-DraI/NcoI	--
pp _Δ -DHFR/3Arg		-TaqI/NotI	+Oligo Arg
pp _Δ -DHFR/3Ser			+Oligo Ser
pp _Δ -DHFR/3*		-DraI/AccI	--

Protein	Klonierungsstrategie			
	Fusion	Verkürzung	Insertion von Nukleotiden	
PP _Δ -DHFR	Bam HI/Bal31 (ppm<--141--)	--	--	
PP _Δ -DHFR/2		-DraI/NotI	--	
PP _Δ -DHFR/2*		-ScaI/Sau96I	--	
PP _Δ -DHFR/3		-ScaI/NotI	--	
PP _Δ -DHFR/3Arg			NcoI/Bal31 (p<--6--) +Oligo Arg	
PP _Δ -DHFR/3Ser			NcoI/Bal31 (p<--6--) +Oligo Ser	
PP _Δ -DHFR/3Thr			NcoI/Bal31 (p<--15--) +Oligo Thr	
PP _Δ -DHFR/1			--	
PD _Δ -DHFR/1	Bam HI/Bal31 (ppm<--150--)	--	--	
PD _Δ -DHFR/2		-DraI/NotI	--	
PD _Δ -DHFR/3Arg		-TaqI/HindIII	+TaqI/HindIII of PP _Δ -DHFR/3Arg	
PD _Δ -DHFR/3Ser			+TaqI/HindIII of PP _Δ -DHFR/3Ser	
PD _Δ -DHFR/3Thr			+TaqI/HindIII of PP _Δ -DHFR/3Thr	

Abb. 4: Aminosäuresequenzen der Hybridproteine zwischen Prepromelittin der Honigbiene und Dihydrofolatreduktase der Maus

Die im "ein-Buchstaben-Kode" angegebenen Aminosäuresequenzen sind aus den DNS-Sequenzen der Hybridgene der entsprechenden Plasmide abgeleitet. Zur Sequenzierung der DNS wurde die Kettenabbruchsmethode mit Didesoxynukleotiden angewendet (Sanger et al., 1977). Die cDNS, kodierend für Hybridproteine, wurde hierzu als EcoRI/HindIII-Fragment aus den *in vitro* Transkriptions-Vektoren ausgeschnitten, durch Agarosegelelektrophorese gereinigt und in den mit EcoRI und HindIII geschnittenen und dephosphorylierten Polylinker des Vectors pUC19 (Vieira und Messing, 1982) durch Inkubation mit T4 DNS-Ligase kloniert. Als Primer für die DNS-Synthesereaktionen dienten synthetische, über Polyacrylamidgele gereinigte Oligonukleotide, die mit Sequenzen des Vektors an der 5'- oder 3'-flankierenden Seite des Polylinkers hybridisierten. Damit konnte die DNS-Sequenz der Hybridproteine vom Aminoterminus bzw. vom Carboxyterminus her bestimmt werden.

Die Grenzen zwischen der Präsequenz, Prosequenz und der Sequenz der reifen Region von Prepromelittin bzw. den Präsequenzen und den Sequenzen der reifen Teile von allen Abkömmlingen Prepromelittins sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die vorgeschlagene Schnittstelle der Präsequenz innerhalb der Vorstufenproteine, deren authentische Schnittstelle entfernt worden war, entspricht den von von Heijne beschriebenen Regeln (von Heijne, 1983 und 1986). Die Zahlen, angegeben als 'DHFR/X-X' für die in den Hybridproteinen vorhandenen Regionen der Dihydrofolatreduktase, beziehen sich auf die Aminosäuresequenz der Dihydrofolatreduktase der Maus (Nunberg et al., 1980). Die Zahl, die im Namen der verschiedenen Proteine 'DHFR/Y' enthalten ist, bezieht sich auf das ungefähre Molekulargewicht (1:>20kD, 2/2*:8,5-11kD, 3/3*:<8,5kD).

Ein Protein wird als reif bezeichnet, falls es die folgenden Bedingungen erfüllt: i) das Auftreten der reifen Form hängt von der Gegenwart von Mikrosomen ab; ii) die reife Form ist resistent gegenüber Proteinase K in der Abwesenheit von Detergenz, aber sensitiv gegenüber Proteinase K in der Gegenwart von Detergenz; iii) die reife Form cofraktioniert mit Mikrosomen nach Sedimentationsanalyse; und iv) die reife Form wird bei pH 11,5 aus Mikrosomen extrahiert (Mostov et al., 1981).

ppm, Prepromelittin der Honigbiene; pp, Präprosequenz von Prepromelittin; p, Präsequenz von Promelittin; DHFR, Dihydrofolatreduktase der Maus; die im Namen der Proteine enthaltenen, tiefgestellten Dreiecke hinter bzw. vor diesen Symbolen kennzeichnen deletierte Bereiche der Aminosäuresequenz vom Carboxyterminus des reifen Melittins (ppm Δ), der Prosequenz (pp Δ), und der Präsequenz (p Δ) bzw. vom Aminoterminus der Dihydrofolatreduktase (Δ DHFR); Δ 'p' bedeutet Prozessierung des Vorstufenproteins zum reifen Protein und 'S' bedeutet Sequestrierung des reifen Proteins durch Hundepankreas-Mikrosomen (M) oder durch Mikrosomen, die mit Trypsin vorbehandelt worden waren (M_T).

pre	pro	melittin	NAME	GRÖÖE	P	S
					M	M _T
MEPLVRYALVPRHYVTISTITAAAPSPFPAPSPRARADADAPRAGIGAYLEVLTTLPALISVIEREKDQD		****	ppm	70	+	+
MEPLVRYALVPRHYVTISTITAAAPSPFPAPSPRARADADAPRAGIGAYLEVLTTLPALISVIEREKDQD-DHFR/1-187		****	ppm-DHFR/1	297	+	+
		-DHFR/1-33-87L	ppm-DHFR/2	106	+	+
		MSFL	ppm-DHFR/3	72	+	+
MEPLVRYALVPRHYVTISTITAAAPSPFPAPSPRARADADAPRAGIGAYLEVLTTLPALG1-DHFR/1-187		****	ppm Δ -DHFR/1	248	+	+
		G1-DHFR/1-33	ppm Δ -DHFR/2	94	+	+
		G1HYSPCVL	ppm Δ -DHFR/3	68	+	+
		G1HYLSESS	ppm Δ -DHFR/3Arg	64	+	+
		G1HYLSESS	ppm Δ -DHFR/3Ser	64	+	+
MEPLVRYALVPRHYVTISTITAAAPSPFPAPSPRARADADAPRAGIGAYLEVLTTLPALISVIEREKDQD-DHFR/33-187		****	ppm Δ -DHFR/3	180	+	+
		L1-DHFR/33-86-89CVL	ppm Δ -DHFR/2	84	+	+
		L1INDSETVPSIPKPLSESS	ppm Δ -DHFR/3	67	+	+
		L1INDSETVPSIPKPLSESS	ppm Δ -DHFR/3Arg	64	+	+
		L1INDSETVPSIPKPLSESS	ppm Δ -DHFR/3Ser	64	+	+
		L1INDSETVPSIPKPLSESS	ppm Δ -DHFR/3	67	+	+
MEPLVRYALVPRHYVTISTITAAAPSPFPAPSPRARADADAPRAGIGAYLEVLTTLPALISVIEREKDQD-DHFR/1-187		****	ppm Δ -DHFR/1	216	+	+
		G1-DHFR/1-87-PL	ppm Δ -DHFR/2	96	+	+
		G1HYRPLRCIYAYSQHNGIGEGDLPPVPLSESPFLSESS	ppm Δ -DHFR/3	70	+	+
		G1HYRPLRCIYAYSQHNGIGEGDLPPVPLSESPFLSESS	ppm Δ -DHFR/3	62	+	+
		G1HYRPLRCIYAYSQHNGIGEGDLPPVPLSESPFLSESS	ppm Δ -DHFR/3Arg	66	+	+
		G1HYRPLRCIYAYSQHNGIGEGDLPPVPLSESPFLSESS	ppm Δ -DHFR/3Ser	66	+	+
		G1HYRPLRCIYAYSQHNGIGEGDLPPVPLSESPFLSESS	ppm Δ -DHFR/3Thr	67	+	+
MEPLVRYALVPRHYVTISTITAAAPSPFPAPSPRARADADAPRAGIGAYLEVLTTLPALISVIEREKDQD-DHFR/1-187		****	ppm Δ -DHFR/1	310	+	+
		L8G1-DHFR/1-87-PL	ppm Δ -DHFR/2	90	+	+
		L8G1HYRPLRCIYAYSQHNGIGEGDLPPVPLSESPFLSESS	ppm Δ -DHFR/3Arg	62	+	+
		L8G1HYRPLRCIYAYSQHNGIGEGDLPPVPLSESPFLSESS	ppm Δ -DHFR/3Ser	62	+	+
		L8G1HYRPLRCIYAYSQHNGIGEGDLPPVPLSESPFLSESS	ppm Δ -DHFR/3Thr	63	+	+

Fünf Klassen von Hybridproteinen zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase wurden erhalten. Sie unterscheiden sich voneinander in der Länge des vom Prepromelittin erhaltenen Anteil. Entsprechend besitzen sie noch eine oder mehrere der charakteristischen strukturellen Eigenschaften des Prepromelittins (Abb. 4). Klasse I enthält Hybridproteine mit dem vollständigen Prepromelittin (ppm-...), Klasse II enthält Hybridproteine mit einem carboxyterminal verkürzten Prepromelittin (ppm Δ -...), Klasse III enthält Hybridproteine mit der vollständigen Präpro-Region, welchen das reife Melittin fehlt (pp Δ -...), Klasse IV enthält Hybridproteine mit carboxyterminal verkürzter Präpro-Region von Prepromelittin (pp Δ -...) und Klasse V enthält Hybridproteine mit carboxyterminal verkürzter Prä-Region von Prepromelittin unter Einführung einer veränderten Schnittstelle für die Signalpeptidase (p Δ -...). Innerhalb jeder Klasse wurden mindestens drei verschiedene Hybridproteinkonstrukte, die sich in der Größe des von der Dihydrofolatreduktase abgeleiteten Teils, d.h. in ihrem Molekulargewicht unterscheiden (.../1, 2, 2*, 3, 3*), hergestellt.

Der Transport der verschiedenen Vorstufenproteine in Mikrosomen aus Hundepankreas wurde in einem gekoppelten in vitro Transkriptions/Translations/Transport-System (Lingappa et al., 1984; Stueber et al., 1984) analysiert. Die Transkription wurde durch Plasmide mit SP6-Promoter gesteuert, der sich vor der für die jeweiligen Vorstufenproteine kodierenden cDNS befindet (Krieg und Melton, 1984). Translation und Transport wurden im Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von Hundepankreas-Mikrosomen ausgeführt (Blobel und Dobberstein, 1975a). Mit Trypsin vorbehandelte Mikrosomen dienten als Test auf Unabhängigkeit von SRP und Dockingprotein (Meyer and Dobberstein, 1980), wie auch auf

Abhängigkeit von der proteasesensitiven Komponente (Zimmermann und Molloy, 1986). Als Kriterien für Insertion eines Vorstufenproteins in die mikrosomale Membran wurde die Entfernung des Signalpeptids, d.h. die Prozessierung durch die Signalpeptidase benutzt (Jackson und Blobel, 1977; Gilmore und Blobel, 1985). Der Transfer des inserierten Proteins über die mikrosomale Membran in das Lumen der mikrosomalen Vesikel wurde durch Prüfung der Resistenz der reifen Form des Proteins gegenüber Verdau durch hinzugefügte Protease gemessen. Sensitivität in Anwesenheit von Detergens zeigte an, daß das Protein nicht per se unempfindlich gegen die Protease war.

3.2.2. Einfluß der Erhöhung des Molekulargewichts auf die SRP/Dockingprotein-Unabhängigkeit des Transports von Prepromelittin

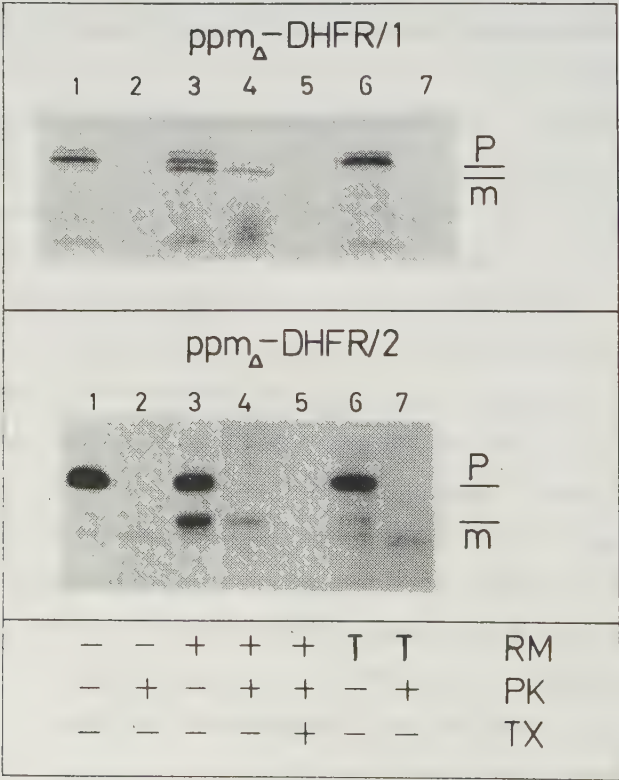
Ein Hybridprotein zwischen dem vollständigen Prepromelittin der Honigbiene und der vollständigen Dihydrofolatreduktase der Maus (ppm-DHFR/1) wurde durch Mikrosomen aus Hundepankreas nur in Gegenwart von aktivem Dockingprotein prozessiert und sequestriert (Abb. 4). Die Entfernung der carboxyterminalen Region aus der Domäne des reifen Melittins (ppm Δ -DHFR/1) oder der vollständigen Domäne des reifen Melittins (pp Δ -DHFR/1) oder des größten Teils der Promelittin-Domäne (pp Δ -DHFR/1) aus diesem Hybridprotein führte zu keiner Veränderung des Transportverhaltens. In allen Fällen resultierten daraus typische sekretorische Proteine im Hinblick auf Dockingprotein-abhängige Prozessierung der Vorläufer und Sequestrierung der reifen Formen (Abb. 4, 5, 6A). Anhand des Vorstufenproteins ppm Δ -DHFR/1 sei ein typischer Test auf Un/Abhängigkeit von SRP und Dockingprotein erläutert.

In Anwesenheit von Mikrosomen entstand zusätzlich zum Vorstu-

Abb. 5: Prozessierung und Sequestrierung von großen Hybridproteinen zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase durch Mikrosomen aus Hundepankreas

Vorstufenproteine wurden nach in vitro Transkription der entsprechenden Plasmide mit SP6 RNS-Polymerase für 45min bei 40°C in einem mit [³⁵S]Methionin supplementierten Kaninchen-Retikulozytenlysat in Abwesenheit von Membranen (Spuren 1 und 2) oder in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen synthetisiert, die entweder vor Zugabe zu den Translationsreaktionen nicht mit Trypsin behandelt worden waren (Spuren 3-5) oder mit Trypsin vorbehandelt worden waren (Spuren 6 und 7). Nach in vitro Translation für 30min bei 37°C wurden die Reaktionsmischungen in drei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot diente als Kontrolle (Spuren 1, 3 und 6) und wurde in Abwesenheit von Proteinase K, die beiden anderen Aliquots wurden in Gegenwart von Proteinase K in Abwesenheit von Triton X-100 (Spuren 2, 4 und 7) oder Anwesenheit von Triton X-100 (Spur 5) für 60min bei 0°C inkubiert. Daraufhin wurden alle Proben auf 1mM PMSF eingestellt, zweifach mit doppelt-konzentriertem Probenpuffer verdünnt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; PK, Proteinase K; TX, Triton X-100; T, mit Trypsin vorbehandelte Mikrosomen.



fenprotein ein weiteres radioaktiv markiertes Protein geringeren Molekulargewichts (Abb. 5; Spur 3). Nur diese reife Form des Vorstufenproteins war gegenüber hinzugefügter Proteinase K resistent. Das Vorstufenprotein selbst wurde sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Mikrosomen abgebaut (Abb. 5; Spuren 2 und 4). Nach Solubilisierung der Mikrosomen durch Zugabe von Detergens war auch die reife Form für Proteasen zugänglich (Abb. 5; Spur 5). Die Verwendung von Trypsin behandelten Mikrosomen führte dagegen zu keiner reifen Form des Vorstufenproteins (Abb. 5; Spuren 6 und 7). Erst die Rekonstitution dieser Mikrosomen mit dem 52kD-Fragment des Dockingproteins eines Elastase-Extrakts aus Mikrosomen stellte die Prozessierungs- und Sequestrierungsaktivität der Mikrosomen für diese Vorstufenproteine wieder her (Abb. 6A und 6B).

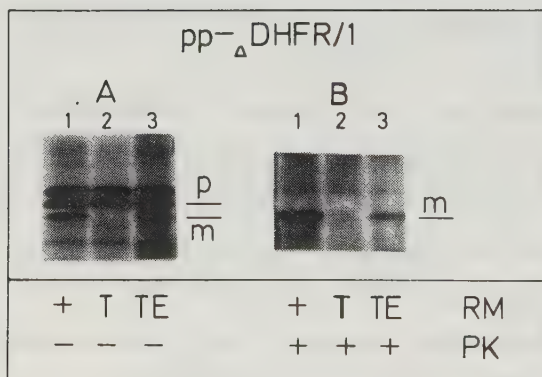
Die Entfernung der vollständigen Promelittin-Domäne einschließlich der ursprünglichen Spaltstelle der Signalpeptidase ergab ein Vorstufenprotein (p_{Δ} -DHFR/1), welches mit der gleichen Effizienz prozessiert und sequestriert wurde wie die Hybridproteine mit der ursprünglichen Spaltstelle (Abb. 4). Der Transport dieses Vorstufenproteins (p_{Δ} -DHFR/1) erforderte ebenfalls aktives Dockingprotein (Abb. 4).

Die Verkürzung dieser Hybridproteine durch Entfernung carboxy-terminaler Anteile der Dihydrofolatreduktase bis auf ein Molekulargewicht von 9kD führte zu keinem Verlust der Abhängigkeit von SRP und Dockingprotein im Hinblick auf Prozessierung und Sequestrierung der entsprechenden Vorstufenproteine (Abb. 4; Abb. 5: ppm_{Δ} -DHFR/2). Das kleinste hier gewonnene Vorstufenprotein, dessen Transport in Mikrosomen die Wechselwirkung zwischen SRP und Dockingprotein erfordert, besitzt 84 Aminosäuren (Abb. 4: pp_{Δ} -DHFR/2).

Abb. 6: Wirkung der Trypsin-Behandlung von Mikrosomen und ihrer Rekonstitution mit Dockingprotein-Fragment auf die Prozessierung und Sequestrierung von großen Vorstufenproteinen

Die Synthese von Vorstufenproteinen in einem mit [³⁵S]Methionin supplementierten Kaninchen-Retikulozytenlysat erfolgte in Gegenwart von Hundepankreas-Mikrosomen, die entweder vor Zugabe zu den Translationsreaktionen nicht mit Trypsin vorbehandelt worden waren (Spur 1) oder mit Trypsin behandelt worden waren (Spur 2) oder mit Trypsin behandelt und mit 1µl eines Elastase-Extraktes aus Mikrosomen supplementiert und für 15min bei 0°C vorinkubiert worden waren (Spur 3) (Meyer und Dobberstein, 1980). Nach in vitro Translation für 30min bei 37°C wurde jede Probe in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde durch Gelelektrophorese und Fluorographie ohne vorherige Protease-Behandlung (A), das andere Aliquot nach Protease-Behandlung (B) analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; PK, Proteinase K; T, mit Trypsin vorbehandelte Mikrosomen; TE, mit Trypsin vorbehandelte und mit Elastase-Extrakt aus Mikrosomen supplementierte Mikrosomen.



Diese Ergebnisse zeigen, daß die Signalsequenz von Prepromelittin mit SRP und Dockingprotein in Wechselwirkung treten kann und daß diese Wechselwirkung im Falle der von Prepromelittin abgeleiteten Vorstufenproteine mit einem Molekulargewicht von $\geq 9\text{kD}$ tatsächlich stattfindet. Diese größeren Vorstufenproteine benötigen ein aktives Dockingprotein für die Insertion in und möglicherweise den Transfer über die mikrosomale Membran zumindest, wenn sie in Gegenwart von SRP synthetisiert werden. Offenbar gibt es keine Beschränkungen für die Struktur des reifen Teils der Dockingprotein-abhängigen Vorstufenproteine, da Hybridproteine mit der Signalsequenz von Prepromelittin, aber völlig unterschiedlichen reifen Teilen, mit vergleichbarer Effizienz in Mikrosomen transportiert werden. Darüberhinaus liefern diese Ergebnisse einen ersten Hinweis darauf, daß die Unabhängigkeit des Transports von SRP und Dockingprotein in der geringen Größe von Prepromelittin begründet ist.

3.2.3. Die Rolle des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine im SRP/Dockingprotein-unabhängigen Transport

Es stellte sich nun die Frage, ob allein die geringe Größe des reifen Teils von Vorstufenproteinen, die mit einer funktionellen Signalsequenz ausgestattet sind, den von SRP und Dockingprotein unabhängigen Transport in Mikrosomen garantiert oder ob auch die Aminosäuresequenz des reifen Teils einen Einfluß auf das Transportverhalten von kleinen Vorstufenproteinen besitzt.

3.2.3.1. Bedeutung der Größe des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine für den Transport in Mikrosomen

Die weitere Verkürzung der oben beschriebenen, von SRP und Dockingprotein abhängigen Hybridproteine auf ein Molekulargewicht

von <8,5kD führte zu zwei Arten von Vorstufenproteinen:

i) Vorstufenproteine der einen Art besaßen entweder die vollständige Prepromelittin-Domäne (ppm-DHFR/3) oder die Präsequenz und einen aminoterminalen Teil der Prosequenz ($\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3}$) oder nur einen großen aminoterminalen Teil der Präsequenz und eine veränderte Spaltstelle der Signalpeptidase ($\text{p}_{\Delta}\text{-DHFR/3Thr}$). Alle Vorstufenproteine wurden sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von aktivem Dockingprotein prozessiert (Abb. 4 und 7). Das größte Vorstufenprotein mit Fähigkeit zur von SRP und Dockingprotein unabhängigen Insertion in mikrosomale Membranen besaß 78 Aminosäuren. Die Sequenz dieses Vorstufenproteins enthielt die vollständige Präsequenz und einen kleinen aminoterminalen Teil der Prosequenz von Prepromelittin, sowie ein kurzes Stück der Dihydrofolatreduktase, aus der eine große interne Region entfernt worden war (Abb. 4: $\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/2*}$).

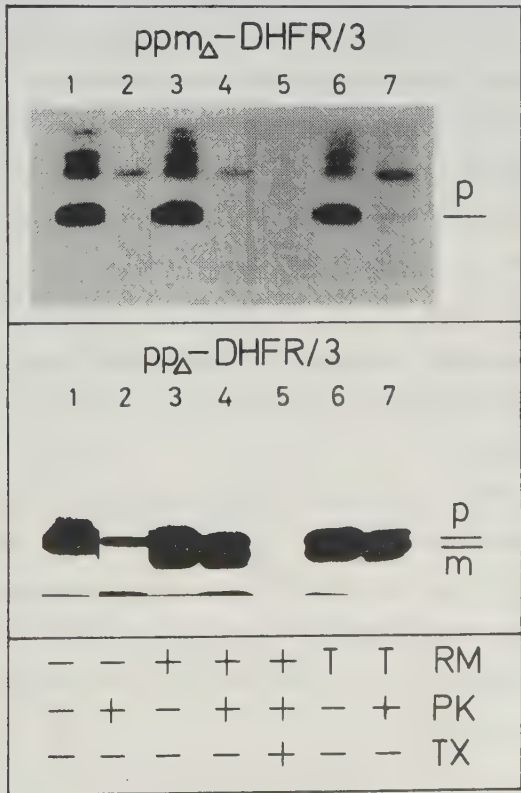
ii) Vorstufenproteine der zweiten Art enthielten entweder die Präsequenz und die vollständige Prosequenz ($\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3}$) oder die Präsequenz und die vollständige Prosequenz zusammen mit der hydrophoben Domäne des reifen Melittins ($\text{ppm}_{\Delta}\text{-DHFR/3}$). Diese Vorstufenproteine wurden von Mikrosomen weder prozessiert noch sequestriert (Abb. 4 und 7).

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß die geringe Größe von Prepromelittin eine Voraussetzung für die Unabhängigkeit von SRP und Dockingprotein darstellt. Darüberhinaus scheint das Vorhandensein einer Signalsequenz die Insertion kleiner Vorstufenproteine in mikrosomale Membranen gewährleisten zu können. Die Untersuchungen zeigen jedoch auch, daß gewisse Einschränkungen in der Aminosäuresequenz des reifen Teils für Dockingprotein-unabhängige Vorstufenproteine vorliegen, da nicht jedes Protein, welches die Signalsequenz von Prepromelittin und ein Molekularge-

Abb. 7: Prozessierung und Sequestrierung von kleinen Vorstufenproteinen zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase durch Mikrosomen aus Hundepankreas

Vorstufenproteine wurden in einem mit [³⁵S]Methionin supplementierten Kaninchen-Retikulozytenlysat in Abwesenheit von Membranen (Spuren 1 und 2) oder in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen synthetisiert, die entweder vor Zugabe zu den Translationsreaktionen nicht mit Trypsin (Spuren 3-5) oder mit Trypsin (Spuren 6 und 7) behandelt worden waren. Nach Translation für 30min bei 37°C wurden die Reaktionsmischungen in drei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot diente als Kontrolle und wurde in Abwesenheit von Proteinase K (Spuren 1, 3 und 6) inkubiert. Die beiden anderen Aliquots wurden in Anwesenheit von Proteinase K in Abwesenheit von Triton X-100 (Spuren 2, 4 und 7) oder Anwesenheit von Triton X-100 (Spur 5) inkubiert. Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben auf 1mM PMSF eingestellt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p. Vorstufe; m. reife Form; RM, Mikrosomen; PK, Proteinase K; TX, Triton X-100; T, mit Trypsin vorbehandelte Mikrosomen.



wicht <8,5kD aufweist, in Mikrosomen transportiert werden kann. Dagegen spielt die hydrophobe Domäne des reifen Melittins in dieser Hinsicht keine Rolle.

Ein Hybridprotein, welches aus dem vollständigen Prepromelittin und einigen zusätzlichen an das Carboxylende angefügten Aminosäuren bestand (ppm-DHFR/3), wurde von mit Trypsin vorbehandelten Mikrosomen zwar prozessiert, aber nicht sequestriert (Abb. 4). Hingegen wurden Hybridproteine von ungefähr gleicher Größe, bei denen die Promelittin-Domäne zum größten Teil bzw. vollständig entfernt worden war (pp Δ -DHFR/3 bzw. p Δ -DHFR/3Thr) in das Lumen der mikrosomalen Vesikel transportiert (Abb. 4 und 7). Offensichtlich hat die Promelittin-Domäne keinen Einfluß auf die Unabhängigkeit der Membraninsertion des Prepromelittins von SRP und Dockingprotein. Weiterhin scheint die unbekannte proteasesensitive Komponente der mikrosomalen Membran nur für den Membrantransfer von Promelittin oder von solchen Hybridproteinen von Bedeutung zu sein, die eine gewisse Region von Promelittin besitzen (siehe weiter unten).

3.2.3.2. Die Bedeutung der Aminosäuresequenz des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine für den Transport in Mikrosomen

Die Aminosäuresequenz des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine beeinflusst offenbar die Fähigkeit dieser Proteine zum Transport in Mikrosomen. Es wurden nun die Folgen der Anwesenheit und der Art der Verteilung von geladenen Aminosäuren, sowie der Anwesenheit einer hydrophoben Domäne innerhalb des reifen Teils für den Transport näher untersucht.

3.2.3.2.1. Auswirkung der Häufung geladener Aminosäuren innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine auf den Transport in Mikrosomen

Vorstufenproteine, die von Prepromelittin abgeleitet wurden und noch die negativ geladene Prosequenz enthielten, jedoch nicht mehr die vier positiv geladenen Aminosäuren im carboxyterminalen Bereich ($\text{ppm}_{\Delta}\text{-DHFR/3}$ und $\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3}$), wurden von Mikrosomen nicht prozessiert und nicht sequestriert (Abb. 4). Durch Anfügen von vier Argininresten an das Carboxylende dieser Proteine wurde die Fähigkeit der entsprechenden Vorstufenproteine ($\text{ppm}_{\Delta}\text{-DHFR/3Arg}$ und $\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3Arg}$) zur Membraninsertion und zum Membrantransfer wiederhergestellt (Abb. 4 und 8). Der vollständige Transfer dieser Hybridproteine über die mikrosomale Membran in das Lumen der mikrosomalen Vesikel wurde durch das Fraktionierverhalten ihrer reifen Formen bei verschiedenen pH-Werten bestätigt. Die reifen Hybridproteine sedimentierten bei pH 7 nach Zentrifugation zusammen mit den Mikrosomen (Abb. 9; Spuren 7 und 8), während sie bei pH 11,5 nach Zentrifugation als lösliche Proteine im Überstand verblieben (Abb. 9; Spuren 9 und 10). Da bei der Extraktion mit alkalischem pH Protein/Lipid-Wechselwirkungen erhalten bleiben und deshalb integrale Membranproteine als Aggregate sedimentieren, mußten sich die reifen Formen der Hybridproteine löslich im Lumen der mikrosomalen Vesikel befinden. Die positiv geladenen Aminosäuren am Carboxylende konnten weder durch vier Serinreste ($\text{ppm}_{\Delta}\text{-DHFR/3Ser}$ und $\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3Ser}$) noch durch eine aus zwei positiv und zwei negativ geladenen Aminosäuren bestehende polare Region ($\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3*}$) ersetzt werden (Abb. 4 und 8). Dies unterstreicht die Bedeutung der positiv geladenen Aminosäuren im carboxyterminalen Bereich von Prepromelittin.

Auf der anderen Seite führte die Entfernung des größten Teils

Abb. 8: Folge der Häufung geladener Aminosäuren innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine auf den Transport

Von Prepromelittin abgeleitete Vorstufenproteine wurden in einem mit [³⁵S]Methionin supplementierten Kaninchen-Retikulozytenlysat in Abwesenheit (Spuren 1 und 2) oder Anwesenheit (Spuren 3-5) von Hundepankreas-Mikrosomen synthetisiert. Nach Inkubation für 30min bei 37°C wurden die Translationsreaktionen in drei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot diente als Kontrolle und wurde in Abwesenheit von Proteinase K (Spuren 1 und 3) inkubiert. Die anderen Aliquots wurden mit Proteinase K in Abwesenheit von Triton X-100 (Spuren 2 und 4) oder in Anwesenheit von Triton X-100 (Spur 5) für 60min bei 0°C inkubiert. Daraufhin wurden alle Proben auf 1mM PMSF eingestellt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; PK, Proteinase K; TX, Triton X-100.

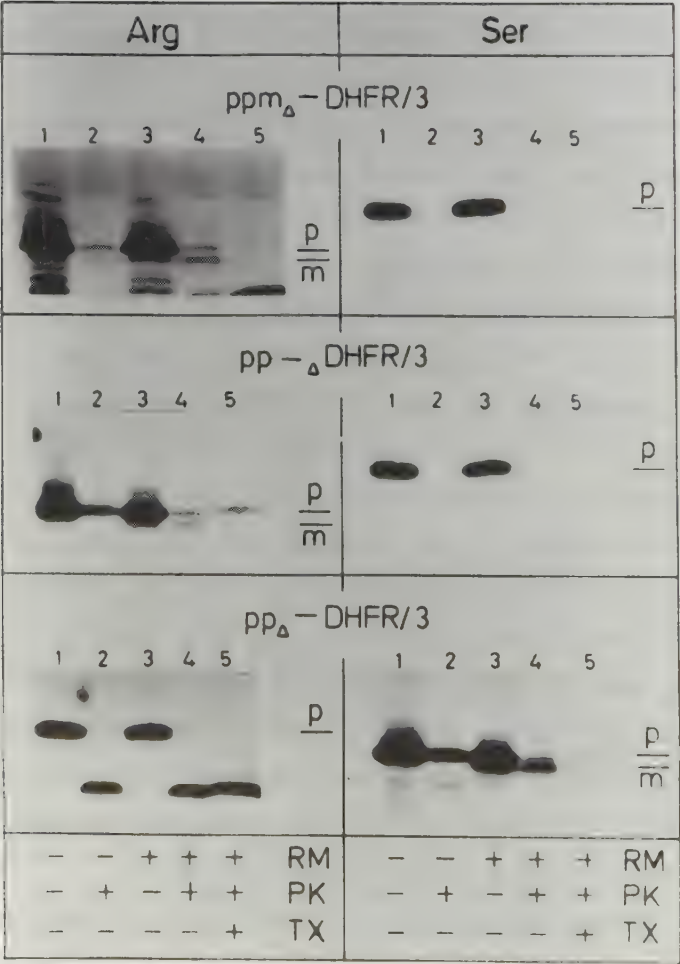
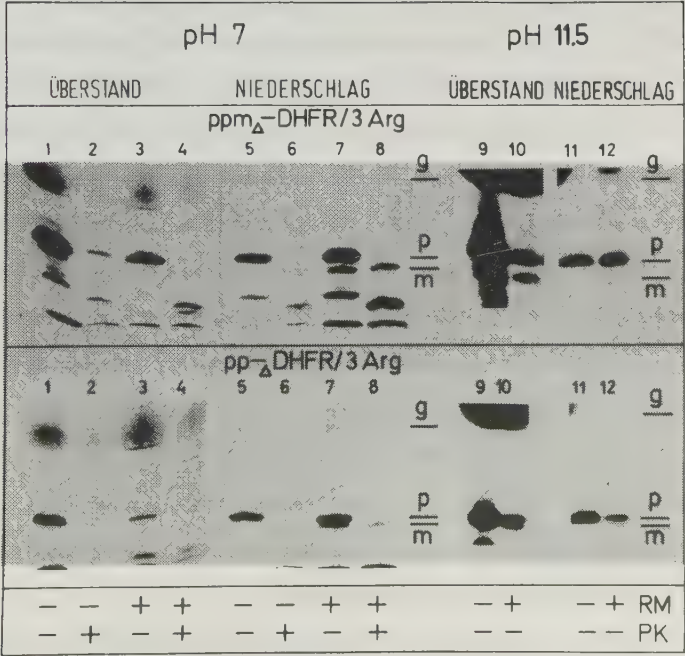


Abb. 9: Fraktionierungsverhalten von kleinen Vorstufenproteinen bei verschiedenen pH-Werten

Vorstufenproteine wurden in mit [³⁵S]Methionin supplementierten Kaninchen-Retikulozytenlysaten in Abwesenheit (Spuren 1, 2, 5, 6, 9 und 11) oder in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 3, 4, 7, 8, 10 und 12) synthetisiert. Nach Translation für 30min bei 37°C wurden die Reaktionsmischungen in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot (pH 7) wurde erneut in zwei Hälften aufgeteilt. Einer Hälfte wurde Proteinase K (Endkonzentration 50µg/ml) (Spuren 2, 4, 6 und 8), der anderen Hälfte H₂O zugefügt (Spuren 1, 3, 5 und 7). Das andere Aliquot wurde durch Zugabe von 1M NaOH (Endkonzentration 50mM) (Mostov et al., 1981) auf pH 11,5 eingestellt (Spuren 9-12). Alle Proben wurden für 45min bei 0°C inkubiert und dann für 30min bei 30psi in einer Beckman "airfuge" mit Rotor A-100/30 zentrifugiert. Die Proben mit zugefügter Proteinase K wurden vor der Zentrifugation auf 1mM PMSF eingestellt. Der Überstand wurde abgenommen und mit demselben Volumen an doppelt-konzentriertem Probenpuffer versetzt (Spuren 1-4, 9 und 10). Der Niederschlag wurde in Probenpuffer aufgenommen (Spuren 5-8, 11 und 12). Die Fraktionen der Überstände und der Niederschläge wurden durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

g, Globin; p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; PK, Proteinase K.



der Promelittin-Domäne mit Ausnahme ihres aminoterminalen Bereichs zu einem Vorstufenprotein (pp_{Δ} -DHFR/3), dessen Insertion in und Transfer über die mikrosomale Membran ohne Hilfe von Dockingprotein erfolgen kann und offensichtlich keine Anhäufung von positiv geladenen Aminosäuren am Carboxylende erfordert (Abb. 4). Das Anfügen von vier Serinresten an das Carboxylende dieses Vorstufenproteins verursachte keine Änderung im Dockingprotein-unabhängigen Transport des daraus hervorgegangenen Hybridproteins pp_{Δ} -DHFR/3Ser (Abb. 4 und 8). Überraschenderweise bewirkte jedoch die Wiederherstellung eines positiv geladenen Carboxylendes bei diesem Vorstufenprotein die vollständige Inaktivierung des neu entstandenen Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3Arg. In Gegenwart von Mikrosomen erfolgte keine Prozessierung oder Sequestrierung dieses Vorstufenproteins (Abb. 4 und 8).

In Abwesenheit der negativ geladenen Prosequenz von Prepromelittin hebt die Einführung von mehreren positiv geladenen Aminosäuren in den carboxyterminalen Bereich eines zuvor mit dem Transport zu vereinbarenden Vorstufenproteins dessen Befähigung zur Membraninsertion und zum Membrantransfer auf. Zusammengefaßt läßt sich daraus folgern, daß die Anhäufungen von positiv oder negativ geladenen Aminosäuren innerhalb der terminalen Bereiche der Promelittin-Domäne gleichzeitig vorhanden sein müssen, um Prepromelittin die Befähigung zum Transport in Hundepankreas-Mikrosomen zu verleihen.

3.2.3.2.2. Auswirkung von einzelnen geladenen Aminosäuren innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine auf den Transport in Mikrosomen

Außer dem Anfügen einer Folge von positiv geladenen Aminosäuren an das Carboxylende, gibt es noch weitere Möglichkeiten der

Strukturveränderung des reifen Teils von Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3Ser, die mit dem Transport in Mikrosomen nicht zu vereinbaren sind:

i) Der Austausch der vier Serinreste am Carboxylende gegen vier Threoninreste unter gleichzeitiger Entfernung einer einzelnen positiv geladenen Aminosäure in der Nähe des Carboxylendes führte zur Inaktivierung des dabei entstandenen Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3Thr im Hinblick auf Prozessierung und Sequestrierung durch Mikrosomen. (Abb. 4 und 10). Der Verlust der Befähigung von Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3Thr zur Membraninsertion wird wahrscheinlich nicht durch den Austausch einer Folge von vier Serinresten gegen eine Folge von vier Threoninresten hervorgerufen, sondern wahrscheinlicher durch die Entfernung der einzelnen positiv geladenen Aminosäure Lysin. Dieser Rest befindet sich im aktiven Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3Ser im carboxyterminalen Bereich in der Nähe der vier anfügten Serinreste.

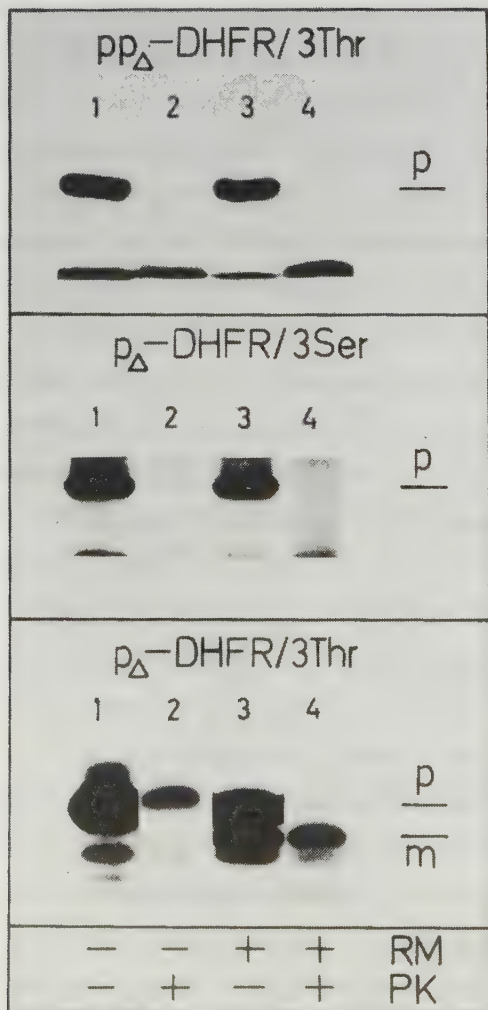
ii) Unfähigkeit zur Membraninsertion wie auch zum Membrantransfer wurde auch nach Austausch einiger Aminosäuren beobachtet, die die ursprüngliche Spaltstelle der Signalpeptidase im zum Transport befähigten Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3 bildeten. Die verhinderte Prozessierung und Sequestrierung des dabei neu entstandenen Vorstufenproteins (p_{Δ} -DHFR/3Ser) mag auf das Fehlen von bestimmten Aminosäuren im aminoterminalen Bereich der aus Prepromelittin stammenden Prosequenz, einschließlich einer einzelnen Glutaminsäure zurückzuführen sein.

Das gegenüber der Präsequenz von Prepromelittin veränderte Signalpeptid dieser kleinen Vorstufenproteine wurde von SRP und Signalpeptidase erkannt, sofern es in größeren Vorstufenproteinen (p_{Δ} -DHFR/1 und p_{Δ} -DHFR/2) vorhanden war. Diese Hybridproteine wurden nämlich mit hoher Effizienz in Gegenwart von aktivem Dok~

Abb. 10: Folge von einzelnen geladenen Aminosäuren innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine auf den Transport

[³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten in Abwesenheit von Membranen (Spuren 1 und 2) oder in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 3 und 4) synthetisiert. Nach Translation für 30min bei 37°C wurden die Reaktionsmischungen in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot diente als Kontrolle und wurde in Abwesenheit von Proteinase K (Spuren 1 und 3) inkubiert. Dem anderen Aliquot wurde Proteinase K zugefügt (Spuren 2 und 4). Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben auf 1mM PMSF eingestellt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; PK, Proteinase K.



kingprotein von Mikrosomen prozessiert und sequestriert (Abb. 4). Die fehlende Prozessierung der Vorstufenproteine mit veränderter Spaltstelle (p_{Δ} -DHFR/3Arg und p_{Δ} -DHFR/3Ser) durch Mikrosomen scheint deshalb die Unfähigkeit dieser Proteine zur Membraninsertion wiederzuspiegeln. Es ist zu vermuten, daß nicht die Struktur des veränderten Signalpeptids oder die veränderte Spaltstelle, sondern die Struktur des veränderten reifen Teils für dieses Unvermögen verantwortlich ist.

Die Vereinigung des aminoterminalen Bereichs des inaktiven Vorstufenproteins p_{Δ} -DHFR/3Ser mit dem carboxyterminalen Bereich des inaktiven Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR3/Thr führte zu einem Vorstufenprotein, welches auch in Abwesenheit von Dockingprotein von Mikrosomen prozessiert und sequestriert wurde (Abb. 4 und 10). Das dabei entstandene Vorstufenprotein p_{Δ} -DHFR/3Thr besaß weder die im Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3Ser vorhandene Glutaminsäure im aminoterminalen Bereich des reifen Teils, noch das im Vorstufenprotein p_{Δ} -DHFR/3Ser vorhandene Lysin im carboxyterminalen Bereich des reifen Teils (Abb. 4). Die beiden terminalen Regionen des reifen Teils dieses Vorstufenproteins sind also frei von geladenen Aminosäuren. Dieses Ergebnis legt nahe, daß die Fähigkeit der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3 und pp_{Δ} -DHFR/3Ser zur Insertion in mikrosomale Membranen auf einem Ladungsausgleich zwischen der Glutaminsäure in der Nähe des Aminoendes und dem Lysin in der Nähe des Carboxylendes ihres reifen Teils beruht. Außer der Entfernung dieser beiden Aminosäuren wurde bei der Konstruktion des aktiven Vorstufenproteins p_{Δ} -DHFR/3Thr aus den jeweils nur eine von diesen geladenen Aminosäuren besitzenden, inaktiven Vorstufenproteinen pp_{Δ} -DHFR/3Thr und p_{Δ} -DHFR/3Ser noch weitere Aminosäuren verändert. Es ist jedoch anzunehmen, daß diese Veränderungen keine Bedeutung für die Fähigkeit des Vorstu-

fenproteins p_{Δ} -DHFR/3Thr zum Transport in Mikrosomen besitzen. Voraussetzung für die Insertion kleiner Vorstufenproteine in die mikrosomale Membran scheint vielmehr der Ladungsausgleich zwischen einzelnen geladenen Aminosäuren in den amino- und carboxy-terminalen Regionen des reifen Teils oder aber die Ladungsfreiheit beider Enden des reifen Teils zu sein. Kleine Vorstufenproteine, deren reife Teile diesen Bedingungen genügen, werden unabhängig von aktivem Dockingprotein transportiert.

3.2.3.2.3. Auswirkung einer hydrophoben Domäne innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine auf den Transport in Mikrosomen

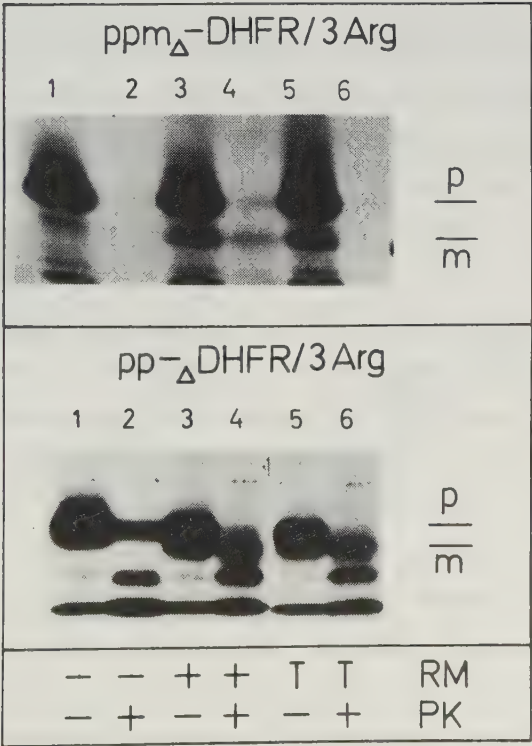
Es wurde bereits festgestellt, daß die proteasesensitive Komponente nur am Membrantransfer von solchen Hybridproteinen beteiligt ist, die wenigstens noch einen Teil der Promelittin-Domäne enthalten. Hybridproteine, die bestimmte Regionen von Promelittin nicht mehr besitzen, sollten deshalb die Identifizierung einer für die Ausbildung der vermuteten Wechselwirkung mit der proteasesensitiven Komponente verantwortlichen Struktur ermöglichen.

Eine Variante von Prepromelittin, bei der das ursprüngliche Carboxylende durch vier Argininreste ersetzt worden war (ppm_{Δ} -DHFR/3Arg), verhielt sich wie das authentische Prepromelittin im Bezug auf die Abhängigkeit des Membrantransfers von der proteasesensitiven Komponente. Mit Trypsin vorbehandelte Mikrosomen, d.h. Mikrosomen mit inaktiver proteasesensitiver Komponente, waren auch in Gegensatz von extern zugesetztem Dockingprotein nicht in der Lage, die reife Form dieses Hybridproteins zu sequestrieren (Abb. 4 und 11). Dagegen wurde die reife Form eines von diesem Hybridprotein abgeleiteten Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3Arg, bei welchem die hydrophobe Domäne von Promelittin gegen eine aus der

Abb. 11: Wirkung der Trypsin-Vorbehandlung von Mikrosomen auf Prozessierung und Sequestrierung von kleinen Vorstufenproteinen durch Mikrosomen aus Hundepankreas

[³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten in Abwesenheit (Spuren 1 und 2) oder Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 3-6) synthetisiert. Die Mikrosomen waren entweder vor Zugabe zu den Translationsreaktionen nicht mit Trypsin behandelt worden (Spuren 3 und 4) oder mit Trypsin behandelt worden (Spuren 5 und 6). Nach Inkubation für 30min bei 37°C wurde jede Reaktionsmischung in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde in Abwesenheit von Proteinase K (Spuren 1,3 und 5), das andere Aliquot wurde in Anwesenheit von Proteinase K (Spuren 2, 4 und 6) für 60min bei 0°C inkubiert. Die Proben wurden auf 1mM PMSF eingestellt und die Mikrosomen durch Zentrifugation in einer Beckman "airfuge" (30psi, Rotor A-100/30, 10min) sedimentiert. Die so erhaltenen Niederschläge wurden in Probenpuffer aufgenommen und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; PK, Proteinase K; T, mit Trypsin vorbehandelte Mikrosomen.



Dihydrofolatreduktase stammende polare Region ausgetauscht worden war (pp_{Δ} -DHFR/3Arg), von Mikrosomen mit inaktivierter protease-sensitiver Komponente sequestriert (Abb. 4 und 11). Darüberhinaus wurde dieses Verhalten im Transfer der reifen Form über die mikrosomale Membran von allen anderen Dockingprotein-unabhängigen Vorstufenproteinen, die keine hydrophobe Domäne besaßen, geteilt (Abb. 4 und 7).

Dies läßt den Schluß zu, daß die proteasesensitive Komponente, die für den Transfer von Promelittin in die mikrosomalen Vesikel erforderlich ist, die Passage der hydrophoben Region des reifen Melittin durch die mikrosomale Membran in das Lumen der Mikrosomen ermöglicht (Abb. 12D und E).

3.2.4. Hypothetische, für den Transport in Mikrosomen erforderliche Konformation von Prepromelittin und von Prepromelittin abgeleiteten Vorstufenproteinen

Die Veränderung der charakteristischen Strukturmerkmale von Prepromelittin durch Manipulation der für Prepromelittin kodierenden cDNS führte zur Identifizierung der strukturellen Voraussetzungen, die es erfüllen muß, damit es unter Beteiligung der proteasesensitiven Komponente unabhängig von SRP und Dockingprotein prozessiert und sequestriert werden kann.

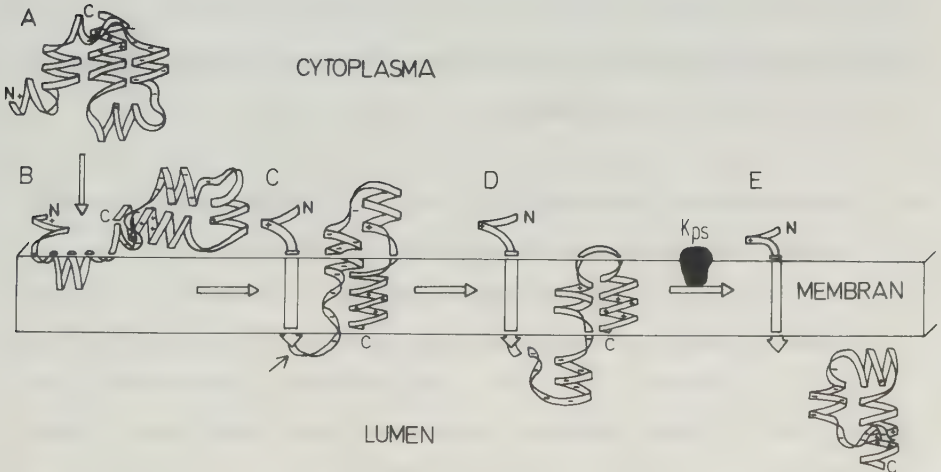
Neben der Größe des Vorstufenproteins scheint die Abwesenheit von Ladungen bzw. der Ladungsausgleich am Amino- und Carboxylende des reifen Teils von Vorstufenproteinen für von SRP und Dockingprotein unabhängige Insertion in die mikrosomale Membran erforderlich zu sein. Entweder dürfen beide terminalen Bereiche des reifen Teils eines Vorstufenproteins nicht gleichzeitig geladene Aminosäuren besitzen oder geladene Aminosäuren an einem Ende müssen durch geladene Aminosäuren mit entgegengesetzter

Abb. 12: Hypothetische transportkompetente Struktur von Prepromelittin und ihre Interaktion mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums

- A) Lösliche Vorstufe von Prepromelittin im Cytoplasma
- B) Assoziation der Signalsequenz von Prepromelittin mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums
- C) Insertion der Vorstufe von Prepromelittin in die Membran des endoplasmatischen Retikulums und Abtrennung der Signalsequenz von Prepromelittin
- D) Transfer von Promelittin über die Membran des endoplasmatischen Retikulus
- E) Lösliches Promelittin im Lumen des endoplasmatischen Retikulus

Die angenommenen Sekundärstrukturen beruhen auf den von Chou und Fasman vorgeschlagenen Parametern zur empirischen Vorhersage der Konformation von Proteinen (Chou und Fasman, 1978).

→ Signalpeptidase; K_{ps} , proteasesensitive Komponente der mikrosomalen Membran; , β -Faltblatt-Struktur; , α -Helix-Struktur; , β -turn;



Polarität am anderen Ende des reifen Teils ausgeglichen werden. Im Fall von Prepromelittin wird die Anhäufung negativ geladener Aminosäuren im aminoterminalen Bereich der Promelittin-Domäne durch eine Folge von positiv geladenen Aminosäuren im carboxyterminalen Bereich kompensiert.

Möglicherweise beruht die Fähigkeit zum SRP/Dockingprotein-unabhängigen Transport von kleinen Vorstufenproteinen in das endoplasmatische Retikulum allgemein auf den folgenden Strukturprinzipien und der daraus hypothetisch abgeleiteten Konformation des Vorstufenproteins (Abb. 12A und B): i) einer Membran überspannenden Region, gebildet vom hydrophoben Bereich der Signalsequenz und ii) einer in Form einer Haarnadel vorliegenden Region, gebildet vom reifen Teil des Vorstufenproteins, wobei die amino- und carboxyterminalen Bereiche des reifen Teils in unmittelbare Nachbarschaft zueinander geraten und gegebenenfalls durch ionische Wechselwirkungen zwischen den entgegengesetzt geladenen Aminosäuren stabilisiert werden.

3.3. Bedeutung der Konformation und des Energiebedarfs kleiner Vorstufenproteine für den Transport in Mikrosomen

Aus den bisherigen Untersuchungen ging nicht hervor, ob i) der reife Teil kleiner Vorstufenproteine in der Lage ist, die geforderte Konformation in Form einer Haarnadel einzunehmen und ob ii) diese, möglicherweise über beide Enden des reifen Teils fixierte und damit starre "Haarnadel-Struktur" vom Vorläufer wie auch von der reifen Form während des Transports in die Mikrosomen unverändert beibehalten wird. Ist eine bestimmte Konformation des reifen Teils also Voraussetzung für den kompletten Transportvorgang? Falls sie nur für einen bestimmten Schritt benötigt wird, ist sie dann mit den anderen Transportschritten nicht zu

vereinbaren? Wenn nicht, müßte der reife Teil nach einem Transportschritt, der eine bestimmte Konformation erfordert, eine mehr oder weniger ausgeprägte Konformationsänderung erfahren. Eine solche wurde als Arbeitshypothese nach der Membranassoziation des Vorläufers noch vor seiner Insertion in die Membran des endoplasmatischen Retikulums angenommen (Abb. 12C und D).

Der Beantwortung der ersten Frage diene deshalb der Versuch, eine Disulfidbrücke in den reifen Teil der kleinen Vorstufenproteine einzuführen, da dies die Fähigkeit zur Ausbildung einer "schlaufenartigen" Struktur innerhalb des betreffenden Proteins voraussetzt oder zur Folge hat. Die Auswirkung der Disulfidbrücke und damit der stabilisierten "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils auf den Transport der kleinen Vorstufenproteine in Mikrosomen sollte Einsichten zum zweiten Fragenkomplex liefern.

3.3.1. Posttranslationaler Transport von kleinen Vorstufenproteinen in Mikrosomen aus Hundepankreas

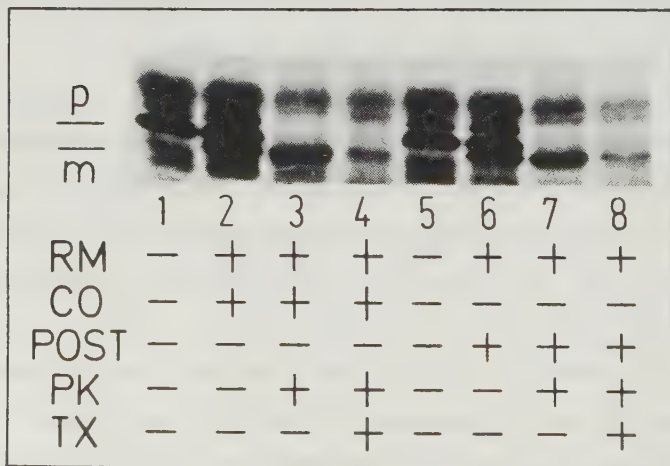
Die experimentelle Analyse des Transports in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten bzw. unter oxidierenden Bedingungen, wie sie die Ausbildung von Disulfidbrücken erfordern, setzt die Fähigkeit der Vorstufenproteine voraus, in Abwesenheit von Proteinsynthese in Mikrosomen aus Hundepankreas transportiert zu werden.

Das größte SRP/Dockingprotein-unabhängige Vorstufenprotein pp_Δ-DHFR/2* wurde durch Mikrosomen prozessiert und sequestriert, die entweder bereits während der Synthese anwesend waren oder erst nach Beendigung der Synthese dem Retikulozytenlysat zugegeben wurden (Abb. 13). Die posttranslationale Inkubation mit Mikrosomen aus Hundepankreas erfolgte unter Bedingungen, welche keine Proteinsynthese mehr zuließen (Daten nicht gezeigt; Wiech et al.,

Abb. 13: Posttranslationaler Transport von kleinen Vorstufenproteinen in Mikrosomen aus Hundepankreas

[35 S]Methionin markiertes Vorstufenprotein pp Δ -DHFR/2* wurde in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 30min bei 37°C in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 2-4) oder für 30min bei 37°C in Abwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen (Spur 1) oder für 10min bei 37°C in Abwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 5-8) synthetisiert. Letzter Ansatz wurde in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde mit Hundepankreas-Mikrosomen für 15min bei 37°C inkubiert (Spuren 6-8), die andere Hälfte mit H₂O (Spur 5). Alle Proben wurden in drei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit Proteinase K in Abwesenheit von Triton X-100 behandelt (Spuren 3 und 7), das zweite Aliquot in Anwesenheit von Triton X-100 (Endkonzentration 0,5%) (Spuren 4 und 8) und das dritte Aliquot wurde nicht mit Proteinase K behandelt (Spuren 1, 2, 5 und 6). Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben auf 1mM PMSF gebracht und anschließend mit Ausnahme der Triton X-100 enthaltenden Proben zentrifugiert (Beckman airfuge, 5min, 25psi). Die Niederschläge wurden in Probenpuffer gelöst, während die Detergenz enthaltenden Ansätze mit demselben Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer verdünnt wurden. Alle Proben wurden durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert. Von den Proben 1-4 wurde nur die Hälfte des Ansatzes auf das Gel aufgetragen.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; CO, cotranslatationaler Transport; POST, posttranslatationaler Transport; PK, Proteinase K, TX, Triton X-100.



1987). Die Effizienz der Prozessierung (Abb. 13; Spuren 2 und 6) des Vorläufers und der Sequestrierung der reifen Form (Abb. 13; Spuren 3 und 7) war bei cotranslationalen Versuchsbedingungen (Abb. 13; Spuren 1-4) nur geringfügig höher als bei posttranslationalen (Abb. 13; Spuren 5-8). Alle anderen von SRP und Dockingprotein unabhängigen Vorstufenproteine wurden ebenfalls in Abwesenheit von Proteinsynthese in Mikrosomen transportiert.

3.3.2. Konstruktion von kleinen Vorstufenproteinen mit zwei Cysteinresten im reifen Teil

In die Plasmide pp_{Δ} -DHFR/3, p_{Δ} -DHFR/3Thr, welche für Vorstufenproteine mit nur einem Cystein in ihrem reifen Teil kodieren, wurde ein zweites für Cystein kodierendes Kodon im Bereich der für den reifen Teil kodierenden cDNS dieser Vorstufenproteine eingeführt. Dazu wurde eine mit Oligonukleotiden gesteuerte Mutagenese nach der Methode der "gapped duplex" DNS durchgeführt (Kramer et al., 1984). Dabei wurde Leucin auf Position 50 im Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3 bzw. auf Position 46 im Vorstufenprotein p_{Δ} -DHFR/3Thr gegen ein Cystein ausgetauscht. Die Position des jeweils neu eingeführten Cysteins wurde so gewählt, daß es sich bei hypothetischer Paarung der entgegengesetzt geladenen Aminosäuren beider Enden des reifen Teils gegenüber dem bereits vorhandenen Cystein auf Position 34 bzw. 30 befand. Dies führte zu den entsprechenden Vorstufenproteinen pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c. Die Aminosäurenaustausche wurden durch Sequenzieren der für die entsprechenden Vorstufenproteine kodierenden DNS mit der Kettenabbruchsmethode bestätigt (Abb. 14).

Der Transport der nun zwei Cysteinreste enthaltenden Vorstufenproteine in Mikrosomen aus Hundepankreas unter Standardbedingungen, d.h. unter reduzierenden Bedingungen, erfüllte die Anfor-

Abb. 14: Aminosäuresequenzen von Hybridproteinen zwischen Prepro-melittin der Honigbiene und Dihydrofolatreduktase der Maus mit einem oder zwei Cysteinrest(en) und geladenen oder ungeladenen Aminosäuren am Amino- und Carboxylende des reifen Teils

Die im "ein-Buchstaben-Kode" angegebenen Aminosäuresequenzen sind aus den DNS-Sequenzen der Hybridgene abgeleitet, die mit der Kettenabbruchsmethode durch Didesoxynukleotide ermittelt wurden (Sanger et al., 1977). Die durch einen Pfeil gekennzeichnete, angenommene Spaltstelle zwischen Signalsequenz und reifem Teil der Vorstufenproteine entspricht den von von Heinje beschriebenen Regeln (von Heijne, 1983, 1986). Die Namen der Proteine wurden in Abb. 4 erklärt mit Ausnahme der aus diesen Proteinen durch Oligonukleotid gesteuerte Mutagenese abgeleiteten Vorstufenproteine. Vorstufenproteine mit einem neu eingeführten Cystein sind durch ein hochgestelltes 'C' gekennzeichnet. Die Vorstufenproteine pp Δ -DHFR/3^c und p Δ -DHFR/3Thr^c unterscheiden sich von den Ausgangsproteinen pp Δ -DHFR/3 und p Δ -DHFR/3Thr durch den Austausch von Leucin gegen Cystein in Aminosäureposition 50 bzw. 46. Zur Konstruktion der entsprechenden Hybridgene wurde das durch Agarosegelelektrophorese gereinigte kleine EcoRI/HindIII-Fragment der für die Ausgangsproteine kodierenden Plasmide in den mit EcoRI und HindIII geschnittenen und dephosphorylierten Polylinker des Plasmids pMa5-8 (Fritz et al., 1984) kloniert. Einzelstrang-DNS von diesen Plasmiden wurde durch Infektion von männlichen, mit diesen Plasmiden transformierten E.coli-Zellen (WK6) (Levinson et al., 1984) mit Helferphagen (M13K07) hergestellt. Mischen der isolierten und gereinigten Einzelstrang-DNS mit dem, über Agarosegel gereinigten großen EcoRI/HindIII-Fragment des Plasmids pMc5-8 (Fritz et al., 1984), nachfolgende Hitzedenaturierung und Renaturierung durch Inkubation bei sinkender Temperatur führten zu einer Doppelstrang-DNS mit einer Einzelstranglücke im Bereich der für das Hybridprotein kodierenden cDNS. Dieses "lückenhafte" Plasmid wurde mit dem über ein Polyacrylamidgel gereinigten und durch T4 Polynukleotidkinase phosphorylierten, mutagenisierenden Oligonukleotid d(5'AGGCCAGGGGCAGTCTCC3') hybridisiert. Für das Auffüllen der Einzelstranglücke des Plasmids mit Desoxynukleotiden und das kovalente Schließen der DNS zum geschlossenen Doppelstrang wurde eine Kombination von Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase I und T4 DNS-Ligase verwendet (Kramer und Fritz, 1986). Die Reaktionsmischung wurde sodann einer alkalischen Saccharosegradientenzentrifugation (5-20%) unterworfen. Die geschlossene zirkuläre DNS wurde isoliert und zur Transformation des reparatur-defizienten E.coli-Stamms WK6mutS benutzt. DNS der gemischten Phasmid-Population wurde aus Chloramphenicol resistenten (25µg/ml Chloramphenicol) Transformanten mit der alkalischen Lyse-Prozedur isoliert und durch Transformation des Suppressor defizienten E.coli-Stamms WK6 in homogene DNS segregiert. Chloramphenicol resistente und Ampicillin sensitive Klone wurden auf Einbau des mutagenen Oligonukleotids durch zwei Zyklen einer Koloniehybridisierung unter hoher Stringenz untersucht, für die am 5'-Ende durch T4 Polynukleotidkinase mit [³²P] markierte Oligonukleotide zur Anwendung kamen. Das kleine EcoRI/HindIII-Fragment von Plasmiden, isoliert aus Transformanten mit positiver Hybridisierung, wurde in Plasmid pUC19 zur DNS-Sequenzierung und in Plasmid pSP65 zur in vitro Transkription kloniert.

'Typ' bezieht sich auf Kompetenz (C) oder Inkompetenz (I) der Vorstufenproteine, von Hundepankreas-Mikrosomen prozessiert und sequestriert zu werden.

[illegible]

derungen, welche für die entsprechenden Vorstufenproteine mit nur einem Cystein erhoben worden waren (Daten nicht gezeigt).

3.3.3. Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des reifen Teils von kleinen Vorstufenproteinen

3.3.3.1. Nachweis der Disulfidbrücken durch HPLC-Analyse der Vorstufenproteine

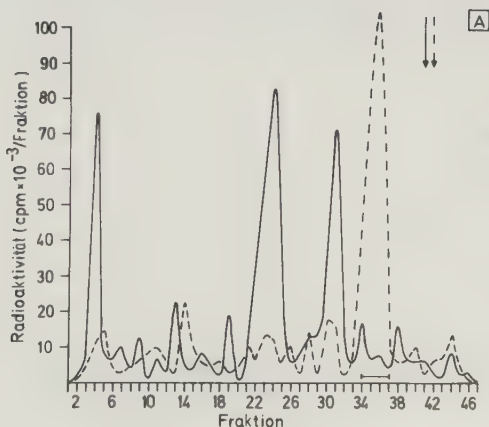
Die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinresten des reifen Teils wurde durch HPLC-Analyse von tryptischen Peptiden der oxidierten bzw. reduzierten Vorstufenproteine untersucht (Nicholson et al., 1987). Dazu wurden die Vorstufenproteine mit [^{35}S]Cystein markiert. Trypsin besitzt nur eine Spaltstelle zwischen den beiden Cysteinresten dieser Polypeptide. Außerhalb dieses Bereichs sind noch weitere Spaltstellen vorhanden.

Trypsinverdau unter reduzierenden Bedingungen spaltete das Vorstufenprotein pp Δ -DHFR/3 c in zwei mit [^{35}S]Cystein markierte Peptide mit 16 bzw. 10 Aminosäuren. Das kleinere Peptid wurde mit Fraktion 24, das größere Peptid mit Fraktion 31 von der Säule eluiert (Abb. 15A; durchgezogene Linie). In einem parallelen HPLC-Lauf eluierte der unverdaute und reduzierte Vorläufer in Fraktion 41 (Abb. 15A; durchgezogener Pfeil). Wurde der Trypsinverdau jedoch unter oxidierenden Bedingungen ausgeführt, war nur ein Radioaktivitätsmaximum in Fraktion 36 zu beobachten. Dieses sollte beide Peptide, durch eine Disulfidbrücke miteinander gekoppelt, enthalten (Abb. 15A; unterbrochene Linie). Das angenommene dimere Peptid eluierte deutlich früher von der Säule als der unverdaute und oxidierte Vorläufer (Abb. 15A; unterbrochener Pfeil). Die Identität des Materials in Fraktion 36 aus der

Abb. 15: HPLC-Analyse von oxidierten und reduzierten kleinen Vorstufenproteinen und ihrer tryptischen Peptide

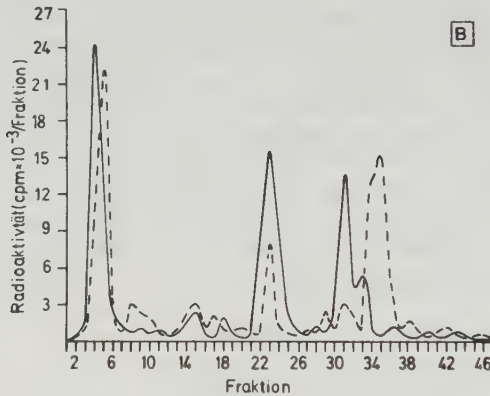
A) [35 S]Cystein markierte Vorstufenproteine pp Δ -DHFR/3 $^{\circ}$ wurde in mit [35 S]Cystein supplementierten Kaninchen-Retikulozytenlysaten (500 μ l Translationsvolumen) für 10min bei 37 $^{\circ}$ C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurde die Probe in zwei Aliquots geteilt. Einem Aliquot wurde K $_3$ Fe(CN) $_6$ (Endkonzentration 10mM), dem anderen H $_2$ O zugefügt. Nach Inkubation für 2min bei 20 $^{\circ}$ C wurden die Proben zweimal mit (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ (Endkonzentration 66% und 55%) präzipitiert und in 60mM NH $_4$ HCO $_3$ pH 8,0 gelöst, welches im Falle der oxidierten Probe zusätzlich 10mM K $_3$ Fe(CN) $_6$ enthielt. Beide Proben wurden daraufhin einer Gelfiltration über eine Sephadex G-25 Säule unterzogen, die mit den gleichen Puffern äquilibriert worden war. Fraktionen von 250 μ l wurden gesammelt und ihre Radioaktivität bestimmt. Die Fraktionen 4 und 5 des ersten Radioaktivitätsmaximums enthielten die markierten Vorstufenproteine. Sie wurden vereint und in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde für 90min bei 37 $^{\circ}$ C mit Trypsin (165 μ g/ml) inkubiert, welches mit Tosylphenylalanylchloromethan vorbehandelt worden war, das andere Aliquot wurde mit H $_2$ O inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese eines Teils der kompletten Reaktionsmischung kontrolliert. Nach Zugabe eines zweifachen molaren Überschusses an Trypsininhibitor und von PMSF (Endkonzentration 2mM) wurde die oxidierte Probe mit K $_3$ Fe(CN) $_6$ (Endkonzentration 10mM) supplementiert. Zu beiden Proben wurde SDS (Endkonzentration 2%) hinzugefügt. Nach Inkubation für 2Std. bei 37 $^{\circ}$ C wurden die Proben mit TFA (Endkonzentration 0,1%) versetzt und einer Analyse durch HPLC mit einer "reverse phase" Säule unterworfen. 47 Fraktionen wurden mit einem linearen Gradienten von 0-50% Acetonitril aus der Säule eluiert und deren Radioaktivität bestimmt. Von den HPLC-Läufen mit unverdaulichem Vorstufenprotein wurde nur die Lage des Maximums, auf das 90% der eingesetzten Radioaktivität entfallen, mit einem Pfeil gekennzeichnet.

(-----) HPLC-Lauf des oxidierten unverdaulichem oder verdaulichem Vorstufenproteins; (————) HPLC-Lauf des reduzierten unverdaulichem oder verdaulichem Vorstufenproteins.

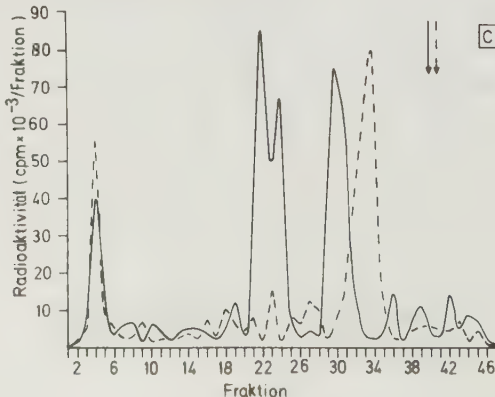


B) Die Fraktionen 34-37 (in Abb. 15A durch eine horizontale Linie gekennzeichnet) des HPLC-Laufs mit verdautem, oxidierten Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3^c wurden vereint und einem zweiten HPLC-Lauf unter denselben Bedingungen unterzogen. Dazu wurde die Probe (6,4ml) unter Vacuum getrocknet, sodann in 1ml 60mM NH_4HCO_3 pH 8,0 gelöst und in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit $K_3Fe(CN)_6$ (Endkonzentration 10mM), das andere Aliquot mit DTT (Endkonzentration 25mM) supplementiert. Nach Inkubation für 2min bei 20°C wurden die Proben mit SDS (Endkonzentration 2%) versetzt und die Inkubation für 2Std. bei 37°C fortgesetzt. Nach Zugabe von TFA (Endkonzentration 0,1%) wurden die Proben, wie oben beschrieben, durch HPLC analysiert.

(-----) HPLC-Lauf der oxidierten Probe; (——) HPLC-Lauf der reduzierten Probe.



C) Der Versuch wurde durchgeführt, wie unter Abb. 15A beschrieben. Zur Oxidation wurde das Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3^c vor dem tryptischen Verdau jedoch mit 10mM $K_3Fe(CN)_6$ in Gegenwart von 5 mM Cystein inkubiert. Das Oxidationsmittel und das Cystein waren entweder für 2min bei 20°C vorinkubiert worden (-----) oder waren nicht vorinkubiert worden (——). Die Pfeile kennzeichnen die Positionen der Radioaktivitätsmaxima der HPLC-Läufe mit den unverdauten Vorstufenproteinen.



Analyse der oxidierten und verdauten Probe wurde durch erneute Chromatographie mit oder ohne vorherige Reduktion geklärt. Unter oxidierenden Bedingungen eluierte die Radioaktivität fast identisch wie beim ersten Lauf, nämlich in Fraktion 35 (Abb. 15B; unterbrochene Linie). Da der für die HPLC benutzte Elutionspuffer keine oxidierenden Reagenzien enthielt, wurde ein kleiner Teil des dimeren Peptids spontan in die beiden monomeren Peptide gespalten. Nach Reduktion des ursprünglich oxidierten Materials wurden jedoch nur zwei Radioaktivitätsmaxima beobachtet (Abb. 15B; durchgezogene Linie). Ihre Positionen in Fraktionen 23 und 31 waren in guter Übereinstimmung mit den Elutionsprofilen der vom reduzierten Vorläufer erzeugten tryptischen Peptide (Abb. 15A; durchgezogene Linie: A im Vergleich zu B). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Annahme, daß Fraktion 36 des HPLC-Laufs mit dem oxidierten und verdauten Vorstufenprotein ein dimeres Peptid enthielt. Dieses besteht aus dem größeren Peptid von 16 Aminosäuren Länge und dem kleineren Peptid von 10 Aminosäuren Länge, welche durch eine Disulfidbindung miteinander verknüpft sind. Reduktion dieser Disulfidbrücke verursacht die Spaltung des dimeren Peptids in die beiden monomeren Peptide. Die entsprechende HPLC-Analyse für das Vorstufenprotein p_{Δ} -DHFR/3Thr^c führte zu ähnlichen Schlußfolgerungen (Daten nicht gezeigt).

In einem Kontrollexperiment wurde die Oxidation des Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3^c vor dem Verdau mit Trypsin in Gegenwart eines Überschusses an freiem Cystein durchgeführt. Das Elutionsverhalten der tryptischen Peptide aus der HPLC-Säule (Abb. 15C; durchgezogene Linie) glich sehr genau dem Elutionsverhalten der unter reduzierenden Bedingungen erzeugten tryptischen Peptide (Abb. 15A; durchgezogene Linie). Vorinkubation von Cystein mit

einem Überschuß an oxidierendem Reagenz vor Zugabe zum Vorstufenprotein verursachte nach tryptischem Verdau und HPLC-Analyse das Auftreten eines einzigen Radioaktivitätsmaximums. Dessen Position (Abb. 15C; unterbrochene Linie) entsprach dem von tryptischen Peptiden, welche unter oxidierenden Bedingungen erzeugt und durch HPLC aufgetrennt worden waren (Abb. 15A; unterbrochene Linie). Die Gegenwart von mit oxidierenden Reagenzien vorbehandelten bzw. nicht vorbehandelten Cystein beeinflusste die Elution des unverdauten Vorstufenproteins von der HPLC-Säule nicht (Abb. 15C; unterbrochene bzw. durchgezogene Pfeile). Dies zeigte der Vergleich mit der HPLC-Analyse von oxidiertem bzw. reduziertem unverdauten Vorstufenprotein (Abb. 15A, unterbrochene bzw. durchgezogene Pfeile).

Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, daß der reife Teil der kleinen, von Prepromelittin abgeleiteten Vorstufenproteine in der Lage ist, im Retikulozytenlysat eine Konformation in Form einer Haarnadel einzunehmen. Diese ermöglicht die Ausbildung einer einzelnen Disulfidbrücke zwischen zwei einander gegenüberstehenden Cysteinresten.

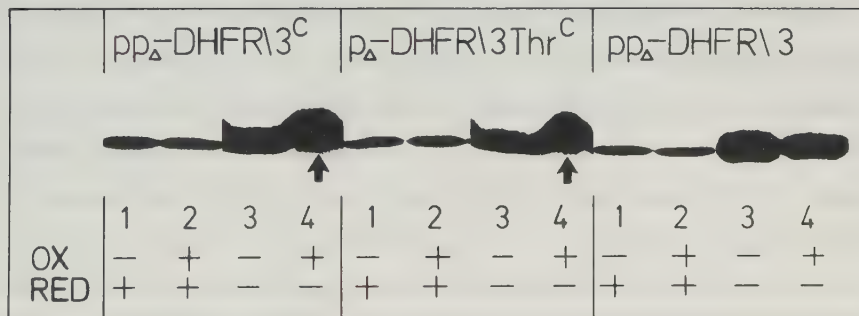
3.3.3.2. Nachweis der Disulfidbrücken durch Gelelektrophorese der Vorstufenproteine

Die Ausbildung einer Disulfidbrücke innerhalb des reifen Teils der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c beeinflusste ihr elektrophoretisches Wanderungsverhalten. Diese Veränderung wurde nach SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese der oxidierten bzw. reduzierten Vorstufenproteine in Anwesenheit oder Abwesenheit von reduzierenden Reagenzien beobachtet. Die oxidierten Proteine zeigten in Abwesenheit von Reduktionsmittel im Gel immer ein etwas höheres apparentes Molekulargewicht als die

Abb. 16: Elektrophoretisches Wanderungsverhalten von kleinen Vorstufenproteinen in reduzierenden und nicht-reduzierenden Polyacrylamidgelen

[³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 10mM) (Spuren 2 und 4), das andere Aliquot mit H₂O (Spuren 1 und 3) für 2min bei 20°C inkubiert. Daraufhin wurde jede Probe in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde mit demselben Volumen an zweifach-konzentriertem und mit 10% Mercaptoethanol supplementierten Probenpuffer verdünnt (Spuren 1 und 2), das andere Aliquot mit Probenpuffer ohne Mercaptoethanol (Spuren 3 und 4). Die Proben wurden durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert. Die Pfeile weisen auf die Verschiebung des apparenten Molekulargewichts der oxidierten Vorstufenproteine hin.

OX, Oxidierende Bedingungen nach Synthese des Vorstufenproteins;
RED, Reduzierende Bedingungen während der Polyacrylamidgelelektrophorese des Vorstufenproteins.



entsprechenden reduzierten Proteine (Abb. 16; Spuren 3 und 4). Die Anwesenheit von Reduktionsmittel während der Elektrophorese der zuvor oxidierten bzw. reduzierten Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/ 3^c und p_{Δ} -DHFR/ $3Thr^c$ führte zu identischem Wanderungsverhalten beider Formen (Abb. 16; Spuren 1 und 2). Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/ 3 , welches nur ein Cystein in seinem reifen Teil besaß, zeigte unter keiner Bedingung Unterschiede im elektrophoretischen Wanderungsverhalten (Abb. 16; Spuren 1-4). Die Anwesenheit einer Disulfidbrücke im reifen Teil verursachte also ein höheres apparentes Molekulargewicht in der nicht-reduzierenden Gelelektrophorese. Deshalb wurde Gelelektrophorese in Abwesenheit von Reduktionsmittel als Standardtest zur Identifizierung von Disulfidbrücken innerhalb des reifen Teils der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/ 3^c und p_{Δ} -DHFR/ $3Thr^c$ benutzt.

Darüberhinaus konnte durch diese Experimente die Bildung von Dimeren oder Multimeren zwischen Cystein enthaltenden Vorstufenproteinen durch intermolekulare Disulfidbindungen ausgeschlossen werden. Nach Gelelektrophorese von oxidierten, Cystein enthaltenden Vorstufenproteinen in Abwesenheit von Reduktionsmittel waren keine radioaktiv markierten Produkte im Molekulargewichtsbereich des Zweifachen oder Mehrfachen von 8kD zu beobachten (Abb. 16).

3.3.4. Auswirkungen von Disulfidbrücken auf den Gesamtvorgang des Transports kleiner Vorstufenproteine in Mikrosomen

Da der reife Teil der von Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase abgeleiteten kleinen Vorstufenproteine offenbar eine "Haarnadel-Struktur" ausbilden kann, stellte sich nun die Frage, ob diese Konformation mit dem Transport in Mikrosomen zu vereinbaren ist.

3.3.4.1. Folgen von intramolekularen Disulfidbrücken im reifen Teil kleiner Vorstufenproteine auf den Transport in Mikrosomen

Die Auswirkung einer Disulfidbrücke innerhalb des reifen Teils der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c auf den Transport dieser Proteine in Mikrosomen aus Hundepankreas wurde unter Bedingungen untersucht, welche die Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken erlaubten. Die Gegenwart von Oxidationsmittel in Retikulozytenlysaten, in denen diese Vorstufenproteine synthetisiert worden waren, verursachte eine völlige Hemmung des Transports in Mikrosomen (Abb. 17; Spuren 4 und 5). Dagegen wurde der Transport von Vorstufenproteinen, die nur ein Cystein im reifen Teil besaßen (pp_{Δ} -DHFR/3 und p_{Δ} -DHFR/3Thr), nicht beeinträchtigt (Abb. 17; Spuren 4 und 5). Die hemmende Wirkung der Oxidation läßt sich somit auf eine Veränderung an den Vorstufenproteinen selbst, d.h. wahrscheinlich auf die Bildung von Disulfidbrücken, und nicht auf Inaktivierung einer der Komponenten des Transportapparates zurückführen.

Die Hemmung des Transports durch Oxidation wurde durch Zugabe eines Überschusses an Reduktionsmittel zum oxidierten Vorstufenprotein wieder aufgehoben (Abb. 17; Spuren 7 und 8). Vorstufenproteine mit intramolekularen Disulfidbrücken, die zum Transport in Mikrosomen nicht befähigt waren, wurden unter diesen Bedingungen wieder in Vorstufenproteine ohne Disulfidbrücken überführt, die nun zum Transport befähigt waren. Die Inaktivierung von kleinen Vorstufenproteinen durch intramolekulare Disulfidbrücken ist demzufolge reversibel.

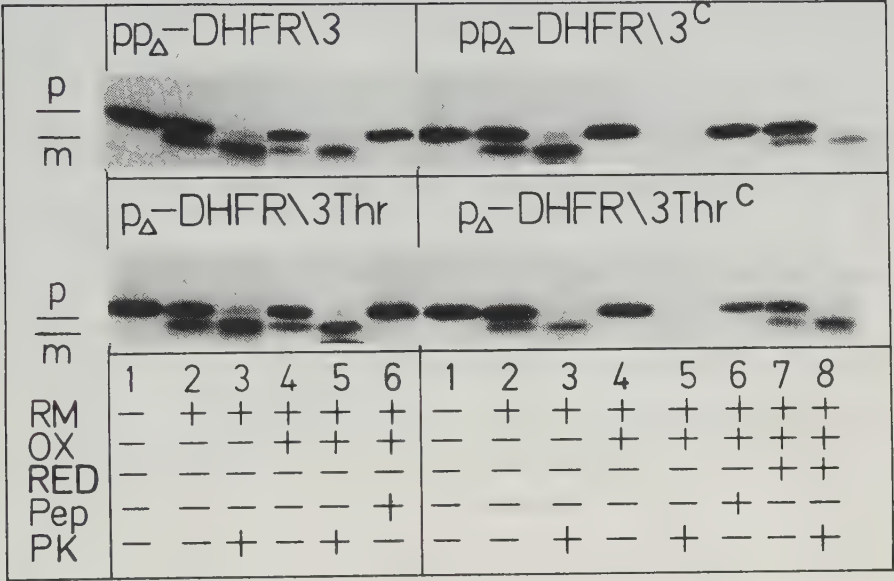
Abb. 17: Wirkung von oxidierenden Bedingungen auf den posttranslationalen Transport kleiner Vorstufenproteine

[³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in mit [³⁵S]Methionin supplementierten Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in drei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit H₂O supplementiert (Spuren 1, 2 und 3), das zweite Aliquot mit K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 10mM) (Spuren 4, 5, 7 und 8) und das dritte Aliquot mit K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 10mM) und einem Cystein enthaltenden kleinen Peptid (16 Aminosäuren) (Spur 6), das aus Vorstufenprotein pp_Δ-DHFR/3 in folgender Weise hergestellt worden war:

Unmarkiertes Vorstufenprotein pp_Δ-DHFR/3 wurde in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat in Abwesenheit von radioaktiv markierten Aminosäuren und in Gegenwart von Hundepankreas-Mikrosomen für 30min bei 37°C synthetisiert (Translationsvolumen 250μl). Die Mikrosomen wurden abzentrifugiert (Beckman airfuge, Rotor A-100/30, 25psi, 5min), in 20mM Tris/Cl (pH 7.4) resuspendiert und mit (NH₄)₂SO₄ (Endkonzentration 66%) präzipitiert. Der in 20mM Tris/Cl (pH 7.4) gelöste Niederschlag wurde auf eine Sephadex G-25 Säule aufgetragen. Die von der Säule eluierten Fraktionen 3-5 (~300μl) wurden vereint, mit TCA (Endkonzentration 5%) präzipitiert und der Niederschlag wurde in 60mM NH₄HCO₃ (pH 8.0) gelöst. Nach Zugabe von Trypsin (150μg/ml, mit Tosylphenylalanylchloromethan vorbehandelt) wurde die Probe für 90min bei 37°C inkubiert und dann mit einem zweifachen molaren Überschuß an Trypsininhibitor versetzt. Die Inkubation wurde für 5min bei 0°C fortgesetzt.

Zur Oxidation wurden die Proben für 2min bei 20°C inkubiert. Dann wurde die Probe, die kein K₃Fe(CN)₆ enthielt, in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot erhielt H₂O (Spur 1), das andere Aliquot, wie auch die Proben, denen K₃Fe(CN)₆ zugefügt worden war, erhielten Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 2-8). Nach Inkubation für 5min bei 37°C wurden die mit K₃Fe(CN)₆ supplementierten Proben in zwei Hälften geteilt. Einer Hälfte wurde DTT (Endkonzentration 20mM) (Spuren 7 und 8) zugesetzt, der anderen Hälfte H₂O (Spuren 4 und 5). Die Inkubation wurde für 10min bei 37°C fortgesetzt. Daraufhin wurde jede Probe in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit Protease K behandelt (Spuren 3, 5 und 8), die andere Hälfte wurde nicht behandelt (Spuren 1, 2, 4, 6 und 7). Nach Fällung mit (NH₄)₂SO₄ wurden alle Ansätze in Probenpuffer gelöst und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; OX, Oxidierende Bedingungen nach Synthese des Vorstufenproteins; RED, Reduzierende Bedingungen während der Anwesenheit der Mikrosomen; PEP, Zugabe von Peptid nach Synthese des Vorstufenproteins; PK, Proteinase K.



3.3.4.2. Folgen von intermolekularen Disulfidbrücken auf den Transport kleiner Vorstufenproteine in Mikrosomen

Zwei alternative Erklärungsmöglichkeiten für die hemmende Wirkung von Disulfidbrücken im reifen Teil von Vorstufenproteinen auf den Transport mußten in Erwägung gezogen werden: Die Hemmung des Transport wird i) durch die Disulfidbrücke an sich oder ii) durch bestimmte Auswirkungen der Disulfidbrücke auf die Konformation des Vorstufenproteins hervorgerufen.

3.3.4.2.1. Disulfidbrücken zwischen freiem Cystein und Cystein enthaltenden kleinen Vorstufenproteinen

Vorstufenproteine, die unmarkiertes Cystein enthielten, wurden im Retikulozytenlysate synthetisiert und durch Oxidation an [^{35}S]Cystein gekoppelt. Diese ausschließlich posttranslational radioaktiv markierten Vorstufenproteine wurden dennoch von Mikrosomen prozessiert und ihre reifen Formen sequestriert (Abb. 18; Spuren 1 und 2). Transport wurde auch beobachtet, als ein Überschuß an freiem, unmarkiertem Cystein nach der Koppelungsreaktion, aber noch vor der Inkubation mit den Mikrosomen zugegeben wurde (Abb. 18; Spuren 3 und 4). Da auch die reifen Formen noch radioaktiv markiert waren, konnte das an die Vorstufenproteine gebundene [^{35}S]Cystein während der Überquerung der mikrosomalen Membran nicht freigesetzt und, nach vom Vorstufenprotein unabhängigem Transport in die Mikrosomen, im Lumen an die reife Form der Vorstufenproteine oxidativ gekoppelt worden sein.

Dies bestätigte ein Experiment, in welchem unmarkiertes Cystein durch Oxidation an unmarkierte Vorstufenproteine gekoppelt worden war. Nach dem Transport in Mikrosomen sollte das unmarkierte Cystein gegen [^{35}S]Cystein durch Reisolierung der

Abb. 18: Folge der oxidativen Koppelung von Cystein an Cystein enthaltende kleine Vorstufenproteine auf den posttranslationalen Transport in Mikrosomen

Unmarkierte Vorstufenproteine wurden in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat in Abwesenheit von radioaktiv markierten Aminosäuren für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in zwei Aliquots geteilt. Dem einen Aliquot wurde [³⁵S]Cystein (Spuren 1-4), dem anderen Aliquot kaltes Cystein (Endkonzentration 5mM) (Spuren 5-8) zugefügt. Für die erste Koppelungsreaktion wurden beide Proben mit K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 10mM) versetzt und für 2min bei 20°C inkubiert. Die Probe mit radioaktiv markiertem Cystein wurde daraufhin in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit kaltem Cystein (Endkonzentration 5mM) supplementiert (Spuren 3 und 4), das andere Aliquot mit H₂O (Spuren 1 und 2). Alle Proben erhielten Hundepankreas-Mikrosomen und wurden für 15min bei 37°C inkubiert. Diese Inkubation stellte für das mit kaltem Cystein supplementierte Aliquot die zweite Koppelungsreaktion dar. Dann wurden die Probe, der noch kein [³⁵S]Cystein zugesetzt worden war, auf einen zweistufigen Saccharosegradienten (s. *Material und Methoden*) aufgetragen und zentrifugiert (Beckman airfuge, Rotor A-100/30, 25psi, 5min). Die Zwischenphase zwischen den beiden Saccharoseschichten wurde abgenommen und mit [³⁵S]Cystein und DTT (Endkonzentration 10mM) in Abwesenheit von Triton X-100 (Spuren 5 und 6) oder Anwesenheit von Triton X-100 (Endkonzentration 0,5%) (Spuren 7 und 8) für 2min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden diese Proben für die zweite Koppelungsreaktion mit K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 25mM) supplementiert und die Inkubation für 5min bei 20°C fortgesetzt. Alle Proben wurden in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K behandelt (Spuren 2, 4, 6 und 8), die andere Hälfte wurde nicht behandelt (Spuren 1, 3, 5 und 7). Nach Fällung mit (NH₄)₂SO₄ (Endkonzentration 66%) wurden alle Proben durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; Cys, Cystein; TX, Triton X-100; PK, Proteinase K; 1st, erste Koppelungsreaktion; 2nd, zweite Koppelungsreaktion.

pp _Δ -DHFR\3									pp _Δ -DHFR\3 ^C								
$\frac{p}{m}$									$\frac{p}{m}$								
p _Δ -DHFR\3Thr									p _Δ -DHFR\3Thr ^C								
$\frac{p}{m}$									$\frac{p}{m}$								
³⁵ S-Cys	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	
Cys	1st		2nd	1st	2nd	1st			1st	1st	2nd	2nd	1st	1st			
TX	-		-		-		+		-		-		-		+		
PK	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	

Mikrosomen, Reduktion, Zugabe von [^{35}S]Cystein und anschließende erneute Oxidation ausgetauscht werden.

Ausschließlich Vorläufer wurde markiert, wenn die zweite Oxidation mit [^{35}S]Cystein in Abwesenheit von Triton X-100 durchgeführt wurde (Abb. 18; Spuren 5 und 6). In Anwesenheit von Triton X-100 erfolgte dagegen radioaktive Markierung sowohl des Vorläufers als auch der reifen Form (Abb. 18; Spuren 7 und 8). Offensichtlich waren entweder das Oxidationsmittel oder Cystein oder beide Substanzen nicht in der Lage, in intakte Mikrosomen einzudringen. Deshalb konnte keine oxidative Koppelung von [^{35}S]Cystein an Vorstufenproteine im Lumen der Mikrosomen erfolgen.

Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß an Vorstufenproteine oxidativ gekoppeltes Cystein während des Transports in Mikrosomen an den Vorstufenproteinen gebunden bleibt. Vorstufenproteine mit einem ($\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3}$ und $\text{p}_{\Delta}\text{-DHFR/3Thr}$) oder sogar zwei ($\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3}^{\text{c}}$ und $\text{p}_{\Delta}\text{-DHFR/3Thr}^{\text{c}}$) über Disulfidbrücken an ihren reifen Teil gebundenen Cysteinrest(en) werden also in Mikrosomen transportiert. Somit sind Disulfidbrücken innerhalb des reifen Teils von kleinen Vorstufenproteinen als kovalente Bindung an sich mit dem Transport in Mikrosomen aus Hundepankreas vereinbar.

3.3.4.2.2. Disulfidbrücken zwischen Mercaptoethanol und Cystein enthaltenden kleinen Vorstufenproteinen

Die Kompatibilität von Disulfidbrücken mit dem Transport in Mikrosomen wurde auch durch den Transport von kleinen Vorstufenproteinen gezeigt, an die Mercaptoethanol oxidativ gekoppelt worden war. Dazu wurden radioaktiv markierte, Cysteinrest(e) enthaltende Vorstufenproteine vor dem Transport in Mikrosomen

entweder mit Mercaptoethanol und nachfolgend mit einem Überschuß an Oxidationsmittel versetzt oder mit Mercaptoethanol, welches mit der gleichen Menge an Oxidationsmittel vorinkubiert worden war. Im ersten Fall wurde bei allen Vorstufenproteinen Prozessierung durch Mikrosomen (Abb. 19A; Spur 4) beobachtet. Im zweiten Fall wurde die Prozessierung von Vorstufenproteinen, die zwei Cysteinreste im reifen Teil enthielten (pp_{Δ} -DHFR/ 3^c und p_{Δ} -DHFR/ $3Thr^c$), nicht jedoch von einem Vorstufenprotein mit nur einem Cystein (pp_{Δ} -DHFR/3) gehemmt (Abb. 19A; Spur 3).

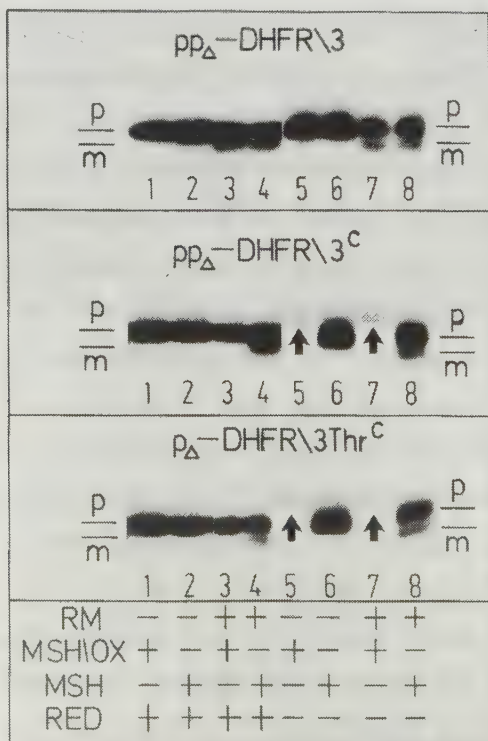
Offensichtlich konnten in Gegenwart von Mercaptoethanol durch Zugabe von Oxidationsmittel keine Disulfidbrücken im reifen Teil der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/ 3^c und p_{Δ} -DHFR/ $3Thr^c$ ausgebildet werden. Die Ursache hierfür liegt jedoch nicht an fehlenden oxidierenden Bedingungen, da die gleichen Mengen an Mercaptoethanol und Oxidationsmittel nach Vorinkubation zur Ausbildung von Disulfidbrücken im reifen Teil dieser Vorstufenproteine führten. Dies bestätigte auch die Analyse dieses Versuchs durch Gelelektrophorese in Abwesenheit von Reduktionsmittel (Abb. 19A; Spuren 5-8). Eine Erhöhung des apparenten Molekulargewichts bei gleichzeitig fehlender Prozessierung durch Mikrosomen wurde bei den Vorstufenproteinen pp_{Δ} -DHFR/ 3^c und p_{Δ} -DHFR/ $3Thr^c$ nur nach Vorinkubation von Mercaptoethanol mit dem Oxidationsmittel (Abb. 19A; Spuren 5 und 7), nicht jedoch nach gleichzeitiger Inkubation (Abb. 19A; Spuren 6 und 8) beider Substanzen mit diesen Vorstufenproteinen beobachtet. Dagegen wurde das elektrophoretische Wanderungsverhalten des Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3 unter keiner Bedingung beeinflußt (Abb. 19A; Spuren 5-8).

Diese Beobachtungen sind mit der Annahme vereinbar, daß Mercaptoethanol durch Oxidation an Cystein enthaltende Vorstufenproteine gekoppelt werden kann und dabei die intramolekulare

Abb. 19: Einfluß der oxidativen Koppelung von Mercaptoethanol an kleine Vorstufenproteine auf den Transport

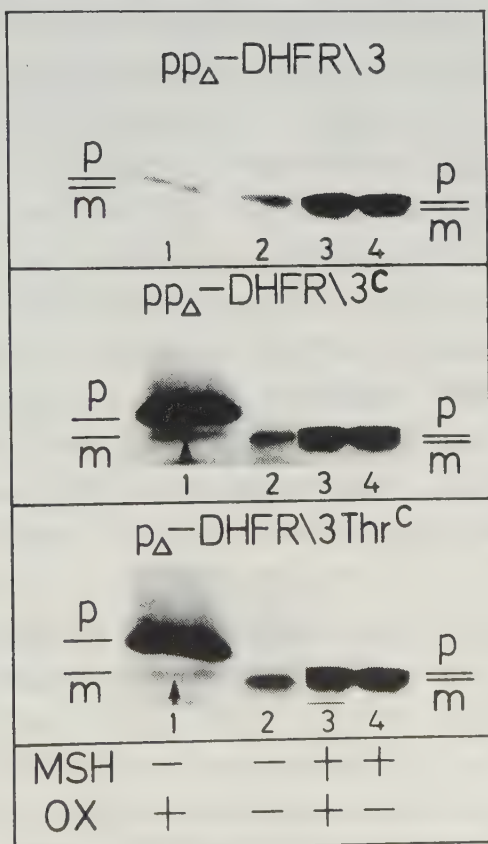
A) [35 S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit einer Mischung aus Mercaptoethanol (Endkonzentration 10mM) und $K_3Fe(CN)_6$ (Endkonzentration 20mM) supplementiert, die für 2min bei 20°C vorinkubiert worden war (Spuren 1, 3, 5 und 7), das andere Aliquot wurde nacheinander mit Mercaptoethanol (Endkonzentration 10mM) und $K_3Fe(CN)_6$ (Endkonzentration 20mM) supplementiert, ohne Vorinkubation der beiden Substanzen (Spuren 2, 4, 6 und 8). Alle Proben wurden für 2min bei 20°C inkubiert und sodann in zwei Aliquots geteilt. Dem einen Aliquot wurden Hundepankreas-Mikrosomen zugegeben (Spuren 3, 4, 7 und 8), dem anderen Aliquot H_2O (Spuren 1, 2, 5 und 6). Nach Inkubation für 15min bei 37°C wurde von allen Proben eine Hälfte mit demselben Volumen an Mercaptoethanol (10%) enthaltendem, zweifach konzentrierten Probenpuffer versetzt (Spuren 1-4), die andere Hälfte mit demselben Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer ohne Mercaptoethanol (Spuren 5-8). Alle Proben wurden durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; MSH/OX, Mercaptoethanol und $K_3Fe(CN)_6$ vorinkubiert; MSH, Mercaptoethanol und $K_3Fe(CN)_6$ nicht vorinkubiert; RED, Reduzierende Bedingungen während Polyacrylamidgelelektrophorese (Probenpuffer mit Mercaptoethanol); Pfeile kennzeichnen Verschiebungen des apparenten Molekulargewichts der Vorstufe.



B) Vorstufenproteine wurden in mit [35 S]Methionin supplementierten Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in zwei Aliquots geteilt. Das eine Aliquot wurde nacheinander mit Mercaptoethanol (Endkonzentration 10mM) und $K_3Fe(CN)_6$ (Endkonzentration 20mM) supplementiert (Spuren 3 und 4), das andere Aliquot mit H_2O (Spuren 1 und 2). Nach Inkubation für 2min bei 20°C wurden allen Proben Hundepankreas-Mikrosomen zugegeben und die Inkubation für 15min bei 37°C fortgesetzt. Die Proben wurden daraufhin auf 4°C abgekühlt, mit Triton X-100 (Endkonzentration 1%) versetzt und in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte erhielt $K_3Fe(CN)_6$ (Endkonzentration 25mM) (Spuren 1 und 3), die andere Hälfte H_2O (Spuren 2 und 4). Nach Inkubation für 1Std. bei 4°C wurden alle Proben mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällt. Die Präzipitate wurden in Probenpuffer ohne Mercaptoethanol gelöst und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; MSH, Zugabe von Mercaptoethanol und $K_3Fe(CN)_6$ nach Synthese; OX, Zugabe von $K_3Fe(CN)_6$ vor Gelelektrophorese; die Pfeile kennzeichnen Veränderungen des apparenten Molekulargewichts des Vorläufers und der reifen Form.



Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den beiden Cysteinresten im reifen Teil verhindert. Aus diesem Grund zeigte die reife Form der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c nach Reisolierung der Mikrosomen und Zugabe eines Überschusses an Oxidationsmittel in Gegenwart von Detergens keine Erhöhung ihrer elektrophoretischen Mobilität in der ohne Reduktionsmittel durchgeführten Gelelektrophorese (Abb. 19B; Spuren 3 und 4). Offensichtlich war Mercaptoethanol noch nach dem Transport der Vorstufenproteine in die Mikrosomen über Disulfidbrücken an die Cysteine der reifen Form gekoppelt. Im Gegensatz dazu konnte im nicht an Mercaptoethanol gebundenen Vorläufer und in seiner reifen Form durch Zugabe eines Überschusses an Oxidationsmittel, welches mit der gleichen Menge an Mercaptoethanol vorinkubiert worden war, in Gegenwart von Detergens eine Disulfidbrücke eingeführt werden. Diese führte zu der erwarteten Verschiebung des apparenten Molekulargewichts (Abb. 19B; Spur 1). Das Laufverhalten des Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3 blieb unter allen Bedingungen unbeeinflusst (Abb. 19B; Spuren 1-4).

Unter der Annahme, daß oxidativ gekoppeltes Mercaptoethanol, ähnlich wie oxidativ gekoppeltes Cystein, während der Membranüberquerung nicht freigesetzt und nachfolgend wieder gebunden wird, unterstützen diese Beobachtungen die Kompatibilität der Disulfidbindung per se mit dem Transport in Mikrosomen.

3.3.4.2.3. Disulfidbrücken zwischen einem oligomeren Peptid und Cystein enthaltenden kleinen Vorstufenproteinen

Andere Gründe als das bloße Vorhandensein der Disulfidbrücke müssen demnach dafür verantwortlich sein, daß Vorstufenproteine nach Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke von Mikrosomen aus Hundepankreas nicht mehr prozessiert und sequestriert

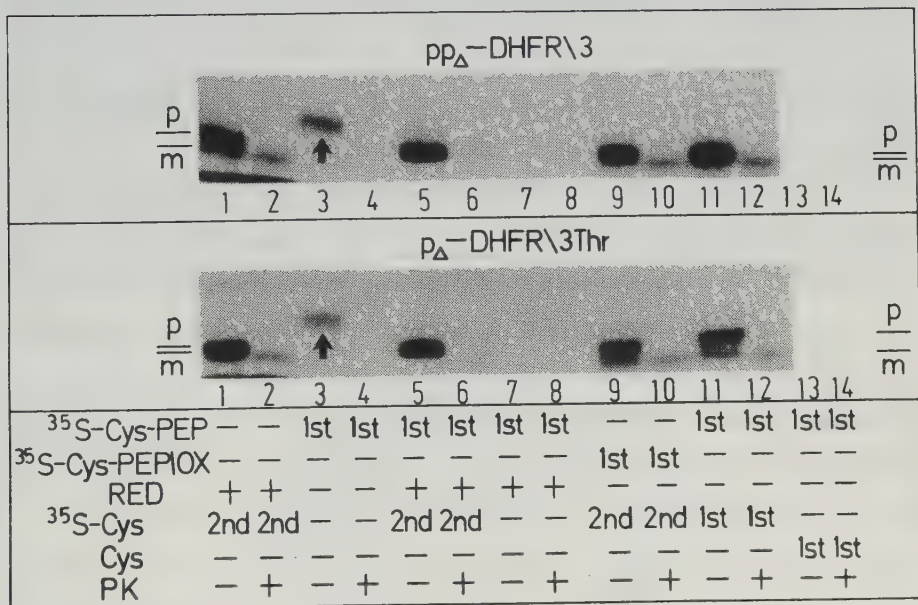
werden. Diese sind möglicherweise in den Auswirkungen der Disulfidbrücke auf die Konformation des Vorstufenproteins zu finden. In solchen strukturellen Veränderungen liegt wahrscheinlich auch die Ursache für die Hemmung des Transports kleiner Vorstufenproteine nach oxidativer Koppelung eines Cystein enthaltenden Peptids mit 16 Aminosäuren (Abb. 17; Spur 6).

Die Koppelung des Peptids an Cystein enthaltende Vorstufenproteine (p_{Δ} -DHFR/3, p_{Δ} -DHFR/3Thr) wurde durch posttranslationale Markierung des Vorläufers mit [35 S]Cystein enthaltendem Peptid vor der Inkubation mit Mikrosomen bewiesen (Abb. 20; Spuren 3 und 4). Diese Koppelung von markierten Peptiden an unmarkierte Vorstufenproteine vor dem Transport führte zur völligen Hemmung der Prozessierung der Vorläufer durch Mikrosomen. Gleichzeitig war das apparente Molekulargewicht der Vorläufer in der ohne Reduktionsmittel durchgeführten Gelelektrophorese erhöht (Abb. 20; Spuren 3 und 4). Wurden diese Vorstufenproteine jedoch nach der Inkubation mit Mikrosomen reduziert und sodann in Anwesenheit von [35 S]Cystein erneut oxidiert, war der Vorläufer mit demselben apparenten Molekulargewicht (Abb. 20; Spuren 5 und 6) zu beobachten, wie der nicht an das Peptid gebundene, posttranslational mit [35 S]Cystein markierte Vorläufer (Abb. 20; Spuren 1 und 2). Vorbehandlung des markierten Peptids mit einem Überschuß an Oxidationsmittel vor Zugabe zu den Vorstufenproteinen und Hinzufügen von [35 S]Cystein nach der Inkubation mit Mikrosomen führte zur Markierung des Vorläufers und seiner reifen Form (Abb. 20; Spuren 9 und 10). Beide wiesen kein erhöhtes apparentes Molekulargewicht auf. Dies wurde auch für die Oxidation der Vorstufenproteine in Gegenwart des markierten Peptids und eines Überschusses an freiem [35 S]Cystein (Abb. 20, Spuren 11 und 12) vor der Inkubation mit Mikrosomen festgestellt.

Abb. 20: Folge der oxidativen Koppelung von Peptiden an Cystein enthaltende Vorstufenproteine auf den posttranslationalen Transport in Mikrosomen

[³⁵S]Cystein markierte Vorstufenproteine wurden in mit [³⁵S]Cystein supplementierten Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben auf sieben Aliquots aufgeteilt. Zu drei Aliquots wurde ein [³⁵S]Cystein enthaltendes tryptisches Peptid gegeben, das aus im Kaninchen-Retikulozytenlysat (Translationsvolumen 100µl) synthetisiertem, mit [³⁵S]Cystein markierten Vorstufenprotein ppΔ-DHFR/3 nach dem in Abb. 16 beschriebenen Verfahren hergestellt worden war (Spuren 3-8). Zwei weitere Aliquots erhielten die gleiche Menge an [³⁵S]Cystein enthaltendem Peptid zusammen mit [³⁵S]Cystein (Spuren 11 und 12) oder mit nicht radioaktiv markiertem Cystein (Spuren 13 und 14). Die beiden übrigen Aliquots erhielten H₂O (Spuren 1 und 2) oder eine Mischung aus [³⁵S]Cystein enthaltendem Peptid und K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 10mM), die für 2min bei 20°C vorinkubiert worden war (Spuren 9 und 10). Alle Proben wurden für die erste Koppelungsreaktion auf eine Konzentration an K₃Fe(CN)₆ von 10mM gebracht und für 2min bei 20°C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben mit Hundepankreas-Mikrosomen supplementiert und die Inkubation für 15min bei 37°C fortgesetzt. Das Aliquot ohne [³⁵S]Cystein markiertes Peptid und zwei Aliquots, denen [³⁵S]Cystein markiertes Peptid zugegeben worden war, erhielten sodann DTT (Endkonzentration 10mM) (Spuren 1, 2 und 5-8), die übrigen Aliquots H₂O (Spuren 3, 4 und 9-14). Nach Inkubation für 2min bei 20°C wurde das nicht mit Peptid, aber mit DTT supplementierte Aliquot, eines der beiden mit Peptid und DTT supplementierten Aliquots, sowie das Aliquot, dem das mit K₃Fe(CN)₆ vorinkubierte Peptid zugefügt worden war, mit [³⁵S]Cystein versetzt (Spuren 1, 2, 5, 6, 9 und 10). Alle anderen Aliquots erhielten H₂O (Spuren 3, 4, 7, 8 und 11-14). Für die zweite Koppelungsreaktion wurde die Konzentration an K₃Fe(CN)₆ für alle Proben auf 25mM eingestellt. Nach Inkubation für 5min bei 20°C wurden alle Proben in zwei Hälften geteilt. Ein Hälfte wurde mit Proteinase K behandelt (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14), die andere Hälfte wurde nicht mit Proteinase K behandelt (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11 und 13). Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben mit PMSF (Endkonzentration 1mM) versetzt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p. Vorstufe; m. reife Form; ^{35}S -Cys-PEP, [^{35}S]Cystein enthaltendes Peptid; ^{35}S -Cys-PEP/OX, vorinkubierte Mischung aus [^{35}S]Cystein enthaltendem Peptid und $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; RED, Zugabe von DTT vor der zweiten Koppelungsreaktion; ^{35}S -Cys, [^{35}S]Cystein; Cys, Cystein; PK, Proteinase K; 1st, erste Koppelungsreaktion; 2nd, zweite Koppelungsreaktion.



Wurde im letzten Fall jedoch anstelle des markierten Cysteins kaltes Cystein eingesetzt, war keine radioaktive Markierung zu beobachten (Abb. 20; Spuren 13 und 14).

Das oligomere, vom Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3 abgeleitete Peptid kann also über eine Disulfidbrücke an kleine Vorstufenproteine gebunden werden und verhindert dabei den Transport der Vorstufenproteine in Mikrosomen.

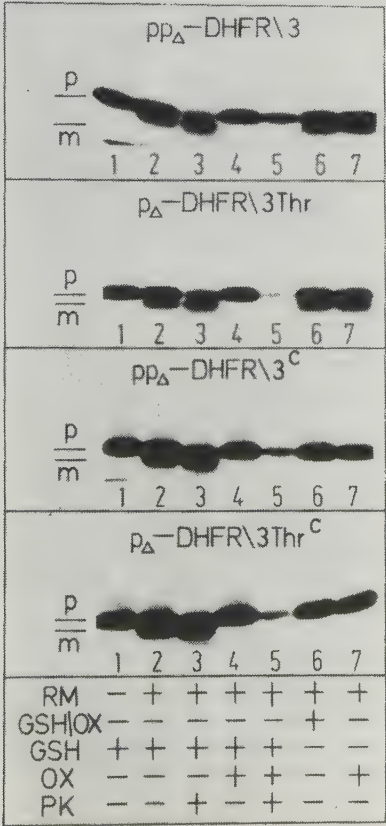
3.3.4.2.4. Disulfidbrücken zwischen Glutathion und Cystein enthaltenden kleinen Vorstufenproteinen

Die beobachtete Hemmung des Transports durch ein gekoppeltes 16er Peptid bestätigte sich auch nach oxidativer Koppelung des Tripeptids Glutathion (Gly-Cys-Glu) an kleine Vorstufenproteine, die ein Cystein (pp_{Δ} -DHFR/3 und p_{Δ} -DHFR/3Thr) oder zwei Cysteine (pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c) enthielten. Unter reduzierenden Bedingungen führte die Anwesenheit von Glutathion erwartungsgemäß (Scheele und Jacoby, 1982) zu keiner Beeinflussung des Transports dieser Vorstufenproteine in Mikrosomen (Abb. 21; Spuren 1-3). Oxidierende Bedingungen in Gegenwart von Glutathion verursachten jedoch eine völlige Hemmung der Prozessierung und Sequestrierung (Abb. 21; Spuren 4 und 5). Die Zugabe von Glutathion, welches mit der gleichen, wie der oben benutzten Menge an Oxidationsmittel vorbehandelt worden war, oder von Oxidationsmittel alleine verhinderte nur die Prozessierung der Vorstufenproteine mit zwei Cysteinresten im reifen Teil. Der Transport der Vorstufenproteine mit nur einem Cystein blieb dagegen unbehelligt (Abb. 21; Spuren 6 und 7). Damit ist die Hemmung des Transports in Gegenwart von Glutathion unter oxidierenden Bedingungen nicht auf die Oxidation an sich, sondern auf die oxidative Koppelung von Glutathion an Vorstufenproteine zurückzuführen.

Abb. 21: Wirkung der oxidativen Koppelung von Gluthadion an kleine Vorstufenproteine auf den Transport in Mikrosomen

Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden im Kaninchen-Retikulozytenlysat für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in sieben Aliquots aufgeteilt. Drei Aliquots wurden mit Gluthadion (Endkonzentration 10mM) versetzt (Spuren 1-3), zwei Aliquots nacheinander mit Gluthadion (Endkonzentration 10mM) und K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 20mM) (Spuren 4 und 5), ein Aliquot mit einer Mischung aus Gluthadion (Endkonzentration 10mM) und K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 20mM), die für 2min bei 20°C vorinkubiert worden war (Spur 6), und ein Aliquot mit K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 10mM) (Spur 7). Nach Inkubation für 2min bei 20°C wurden alle Aliquots mit Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 2-7) supplementiert bis auf ein Aliquot, dem nur Gluthadion zugefügt worden war und das mit H₂O supplementiert wurde (Spur 1). Alle Aliquots wurden für 15min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden eines der beiden Aliquots, denen nur Gluthadion und Mikrosomen und eines der beiden Aliquots, denen nacheinander Gluthadion und K₃Fe(CN)₆ zugesetzt worden war, mit Protease K behandelt (Spuren 3 und 5), das jeweils andere Aliquot, wie auch alle übrigen Aliquots wurden nicht mit Protease K behandelt (Spuren 1, 2, 4, 6 und 7). Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben mit PMSF (Endkonzentration 1mM) versetzt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; GSH/OX, vorinkubierte Mischung aus Gluthadion und K₃Fe(CN)₆; GSH, Gluthadion; OX, K₃Fe(CN)₆; PK, Proteinase K.

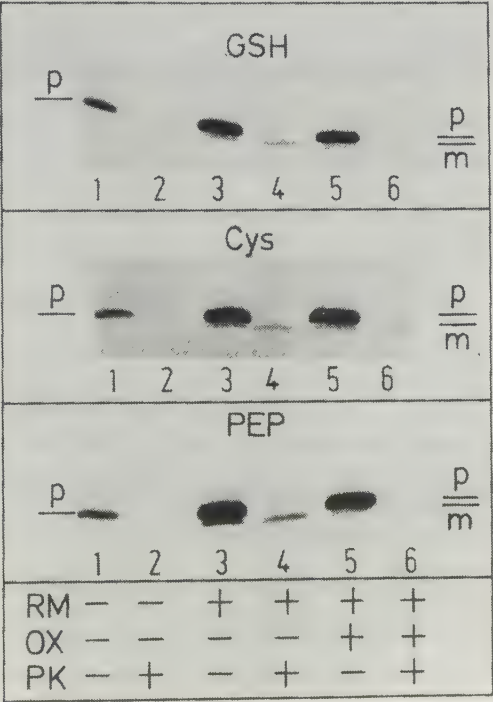


Der Transport des Vorstufenproteins pp- Δ DHFR/3Arg. welches keine Cysteine besitzt, wurde in Gegenwart von Glutathion oder oligomeren Peptid durch oxidierende Bedingungen (Abb. 22; Spuren 5 und 6) in etwa demselben geringen Ausmaß gegenüber reduzierenden Bedingungen (Abb. 22; Spuren 3 und 4) vermindert, wie dies in Gegenwart von Cystein festzustellen war (Abb. 22; Spuren 3-6). Die hemmende Wirkung des Glutathions und des oligomeren Peptids auf den Transport von Cystein enthaltenden Vorstufenproteinen unter oxidierenden Bedingungen war deshalb keine indirekte Folge der Inaktivierung des Transportapparates. Sie ging wahrscheinlich auf die Verzweigung der Polypeptidkette des Vorläufers zurück, die durch die kovalente Koppelung eines Peptids hervorgerufen wurde. Dadurch entstanden Proteine mit zwei Amino- und Carboxylenden.

Abb. 22: Wirkung der Anwesenheit von Cystein enthaltenden Molekü-
len auf den posttranslationalen Transport eines kleinen
Vorstufenproteins, welches kein Cystein enthält

Vorstufenprotein pp-ΔDHFR/3Arg wurde in mit [³⁵S]Methionin supplementierten Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurde die Probe in drei Aliquots aufgeteilt. Das erste Aliquot wurde mit Gluthadion (Endkonzentration 5mM)(GSH), das zweite Aliquot mit unmarkiertem Cystein (Endkonzentration 5mM)(Cys) und das dritte Aliquot mit unmarkiertem Cystein enthaltenden Peptid (PEP) versetzt, das aus im Kaninchen-Retikulozytenlysat synthetisiertem (Translationsvolumen 100ul) Vorstufenprotein pp-ΔDHFR/3, wie in Abb. 16 beschrieben, hergestellt worden war. Jedes Aliquot wurde dann in drei Ansätze gleichen Volumens aufgeteilt. Einem Ansatz wurde K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 10mM)(Spuren 5 und 6), den beiden anderen Ansätzen H₂O (Spuren 1-4) zugegeben. Nach Inkubation für 2min bei 20°C wurde der mit K₃Fe(CN)₆ supplementierte Ansatz und einer der beiden mit H₂O supplementierten Ansätze mit Hundepankreas-Mikrosomen versetzt (Spuren 3-6), während der dritte Ansatz H₂O erhielt (Spuren 1 und 2). Alle Proben wurden für 15min bei 37°C inkubiert und dann in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde mit Protease K behandelt (Spuren 2, 4 und 6), die andere Hälfte wurde nicht mit Protease K behandelt (Spuren 1, 3 und 5). Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden die Proben mit PMSF versetzt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p. Vorstufe; m. reife Form; RM, Mikrosomen; OX, Zugabe von K₃Fe(CN)₆ nach Synthese; PK, Proteinase K; GSH, Anwesenheit von Gluthadion; Cys, Anwesenheit von Cystein; PEP, Anwesenheit von Peptid.



3.3.5. Notwendigkeit von Nukleosidtriphosphaten für den Gesamt- vorgang des Transports von kleinen Vorstufenproteinen

Die Möglichkeit des posttranslationalen Transports der kleinen Vorstufenproteine in Mikrosomen erlaubte es, eine Abhängigkeit dieses Transportvorgangs von Nukleosidtriphosphaten zu überprüfen.

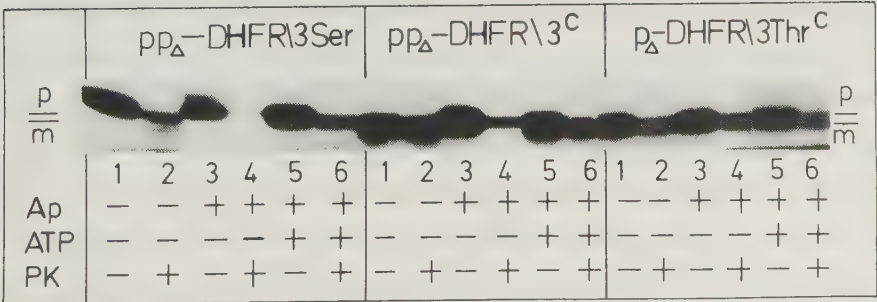
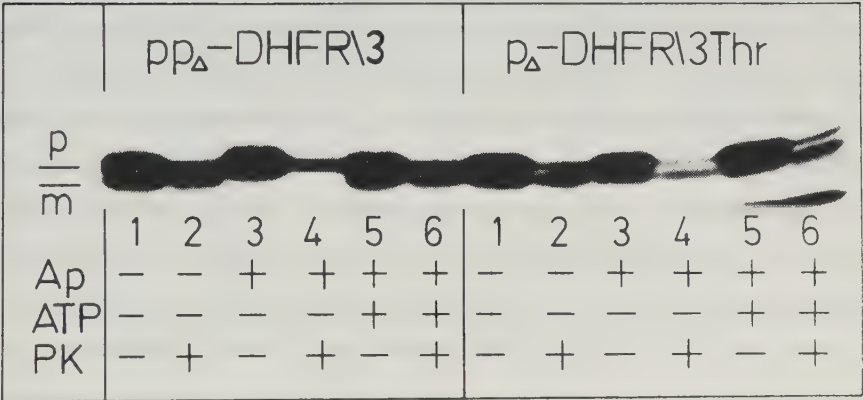
3.3.5.1. Unterschiedlicher Bedarf an Nukleosidtriphosphaten für den Transport kleiner Vorstufenproteine mit unterschied- lichen reifen Teilen

Der Bedarf an Nukleosidtriphosphaten für den Transport von kleinen Vorstufenproteinen (Molekulargewicht $\leq 9\text{kD}$) in Mikrosomen aus Hundepankreas wurde durch Behandlung der Retikulozytenlysate, in denen die entsprechenden Vorläufer synthetisiert worden waren, mit dem ATP hydrolysierenden Enzym Apyrase aus Kartoffel (Waters und Blobel, 1986) untersucht. Die Vorstufenproteine $\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3}$ und $\text{p}_{\Delta}\text{-DHFR/3Thr}$ und die daraus abgeleiteten Vorstufenproteine $\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3}^{\text{c}}$ und $\text{p}_{\Delta}\text{-DHFR/3Thr}^{\text{c}}$ sowie Vorstufenprotein $\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3Ser}$ wurden in Abwesenheit von Apyrase von Mikrosomen prozessiert und ihre reifen Formen sequestriert (Abb. 23; Spuren 1 und 2). Apyrase-Behandlung des Retikulozytenlysats verhinderte jedoch völlig die Prozessierung der Vorstufenproteine $\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3}$, $\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3}^{\text{c}}$ und $\text{pp}_{\Delta}\text{-DHFR/3Ser}$ (Abb. 23; Spuren 3 und 4). Prozessierung und Sequestrierung wurden nach Zugabe einer großen Menge von ATP wiederhergestellt (Abb. 23; Spuren 5 und 6). Offenbar reichte hierzu die Konzentration an ATP trotz weiterhin aktiver Apyrase während der Transportreaktion aus. Dagegen war der Transport der Vorstufenproteine $\text{p}_{\Delta}\text{-DHFR/3Thr}$ und $\text{p}_{\Delta}\text{-DHFR/3Thr}^{\text{c}}$ durch die Behandlung mit den gleichen Konzentrationen an Apyrase (6U/ml) in einem wesentlich geringeren Umfang beein-

Abb. 23: Folge der Entfernung von Nukleosidtriphosphaten aus dem Retikulozytenlysat auf den posttranslationalen Transport kleiner Vorstufenproteine in Mikrosomen

Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in drei Aliquots aufgeteilt. Zwei Aliquots wurden mit Apyrase (6U/ml)(Spuren 3-6) versetzt, das andere Aliquot mit H₂O (Spuren 1 und 2). Nach Inkubation für 5min bei 37°C erhielt eines der beiden mit Apyrase supplementierten Aliquots in 20mM Hepes/KOH (pH 7,4) gelöstes ATP (Endkonzentration 8mM)(Spuren 5 und 6), die beiden anderen Aliquots erhielten H₂O (Spuren 1-4). Daraufhin wurden alle Aliquots mit Hundepankreas-Mikrosomen versetzt und die Inkubation für 15min bei 37°C fortgesetzt. Nachfolgend wurde jedes Aliquot in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde für 60min bei 0°C in Abwesenheit von Proteinase K (Spuren 1, 3 und 5), die andere Hälfte in Anwesenheit von Proteinase K (Spuren 2, 4 und 6) inkubiert. Dann wurden alle Proben mit PMSF (Endkonzentration 1mM) versetzt und mit (NH₄)₂SO₄ gefällt. Das Präzipitat wurde in Probenpuffer gelöst und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; Ap, Apyrase; PK, Proteinase K.



trächtig. Die Prozessierung und Sequestrierung der Vorstufenproteine p_{Δ} -DHFR/3Thr und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c wurde auf etwa 75-80% im Vergleich zu fehlender Apyrase-Behandlung reduziert (Abb. 23; Spuren 3 und 4). Aus praktischen Gründen wird daher im Folgenden der Transport der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3 und pp_{Δ} -DHFR/3^c als NTP-abhängig, der der Vorstufenproteine p_{Δ} -DHFR/3Thr und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c als NTP-unabhängig bezeichnet.

Der wesentliche Unterschied in der Struktur der NTP-abhängigen und NTP-unabhängigen Vorstufenproteine ist die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von geladenen Aminosäuren in den terminalen Bereichen ihrer reifen Teile (Abb. 4 und 14). Andere kleine Vorstufenproteine, die in diesen Regionen zwei einzelne oder zwei Folgen von Aminosäuren mit entgegengesetzten Ladungen besitzen, benötigten ebenfalls Nukleosidtriphosphate für ihren Transport in Mikrosomen. So verhielt sich z.B. das Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3Ser hinsichtlich der Abhängigkeit von Nukleosidtriphosphaten wie die Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3 und pp_{Δ} -DHFR/3^c (Abb. 23). Da Kaninchen-Retikulozytenlysate Phosphat übertragende Enzyme enthalten, die die Synthese der anderen Nukleosidtriphosphate mit Hilfe von ATP katalysieren, bleibt ungeklärt, ob der Entzug von ATP oder eines anderen Nukleosidtriphosphats unmittelbar für die Hemmung des Transports verantwortlich ist.

Diese Ergebnisse legen nahe, daß Unterschiede in der Struktur des reifen Teils der Vorstufenproteine und nicht in der Signalsequenz, die bis auf einige Aminosäuren im Bereich der Spaltstelle der Signalpeptidase bei allen Vorstufenproteinen identisch ist, für den unterschiedlichen Bedarf an Nukleosidtriphosphaten verantwortlich sind. Der Energie erfordernde Schritt während des Transports in Mikrosomen steht offensichtlich in Verbindung mit der Struktur des reifen Teils des Vorstufenproteins.

3.3.5.2. Einfluß von nicht-hydrolyisierbaren ATP-Analoga auf den Transport von kleinen Vorstufenproteinen in Mikrosomen

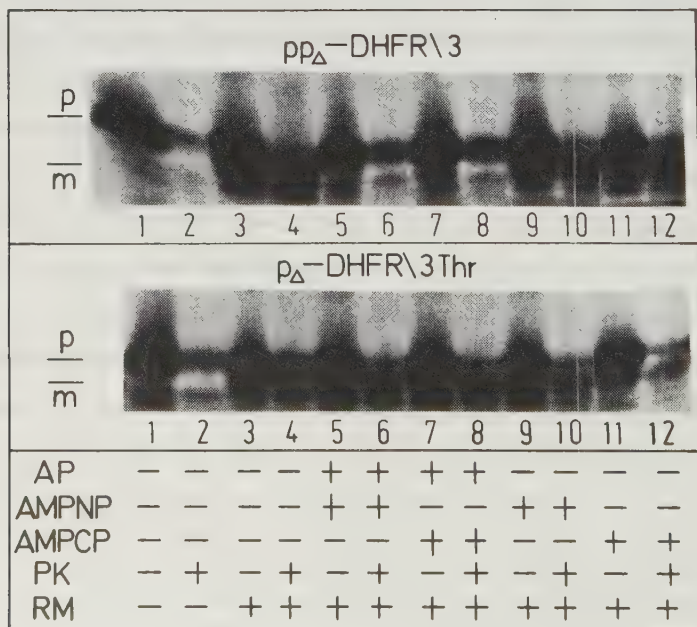
Das NTP-abhängige Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3 und das NTP-unabhängige Vorstufenprotein p_{Δ} -DHFR/3Thr wurden in Abwesenheit von Apyrase und ATP-Analoga durch Mikrosomen prozessiert und ihre reifen Formen sequestriert (Abb. 24; Spuren 1-4). Nach Apyrase-Behandlung, d.h. in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten, konnte der Transport des NTP-abhängigen Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3 durch Zugabe der nicht-hydrolyisierbaren ATP-Analoga AMPNP (Abb. 24; Spuren 5 und 6) und AMPCP (Abb. 24; Spuren 7 und 8) nicht wiederhergestellt werden. Dagegen wurde der Transport des NTP-unabhängigen Vorstufenproteins p_{Δ} -DHFR/3Thr in beiden Fällen kaum beeinflusst (Abb. 24; Spuren 5-8). Die Hydrolyse von ATP wurde also entweder direkt während des NTP-abhängigen Transportschritts oder indirekt zur Bereitstellung oder Regeneration eines anderen Nukleosidtriphosphats benötigt. In Abwesenheit von Apyrase führte die gleichzeitige Gegenwart von ATP und eines Überschusses von einem der beiden ATP-Analoga zu keiner Verminderung des Transports des NTP-abhängigen Vorstufenproteins in Mikrosomen (Abb. 24; Spuren 9-12).

Die beiden ATP-Analoga sind somit gegenüber ATP die schlechteren Substrate für das ATP erfordernde System. Aufgrund dieser Spezifizität bleibt ungeklärt, ob die Hydrolyse von ATP oder eines anderen Nukleosidtriphosphats primär für den Transport von NTP-abhängigen Vorstufenproteinen in Mikrosomen aus Hundepankreas erforderlich ist.

Abb. 24: Einfluß von nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga auf den Transport von kleinen Vorstufenproteinen in Mikrosomen

Mit [35 S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in drei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit Apyrase (6U/ml) (Spuren 5-8), die beiden anderen Aliquots wurden mit H₂O versetzt (Spuren 1-4 und 9-12). Nach Inkubation für 5min bei 37°C wurden der mit Apyrase behandelte Ansatz und einer der beiden unbehandelten Ansätze in zwei Hälften geteilt. Der einen Hälfte wurde in 20mM Hepes/KOH (pH 7,4) gelöstes AMPNP (Endkonzentration 5mM) zugefügt (Spuren 5, 6, 9 und 10), der anderen Hälfte im gleichen Puffer gelöstes AMPCP (Endkonzentration 5mM) (Spuren 7, 8, 11 und 12). Der andere nicht mit Apyrase behandelte Ansatz wurde ebenfalls in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde mit H₂O supplementiert (Spuren 1 und 2), die andere Hälfte, wie auch alle anderen Proben, wurden mit Hundepankreas-Mikrosomen supplementiert (Spuren 3-12). Nach Inkubation für 15min bei 37°C wurden alle Proben in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit Proteinase K behandelt (Spuren 2, 4, 6, 8, 10 und 12), das andere Aliquot wurde nicht mit Proteinase K behandelt (Spuren 1, 3, 5, 7, 9 und 11). Alle Proben wurden für 60min bei 0°C inkubiert, nachfolgend mit PMSF (Endkonzentration 1mM) versetzt und mit (NH₄)₂SO₄ gefällt. Die in Probenpuffer gelösten Präzipitate wurden durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; AP, Apyrase; PK, Proteinase K; RM, Mikrosomen.



3.3.6. Einfluß von Disulfidbrücken im reifen Teil von Vorstufenproteinen und von Energie auf einzelne Schritte des Transports in Mikrosomen

Die Fähigkeit zur Ausbildung einer haarnadelförmigen Struktur als Voraussetzung für SRP/Dockingprotein-unabhängigen Transport kleiner Vorstufenproteine stand im Widerspruch zur Hemmung des Gesamtvorgangs des Transports nach Stabilisierung dieser Struktur. Dies war Veranlassung, den Gesamtvorgang des Transports in Einzelschritte zu zerlegen und diese unabhängig voneinander auf Hemmbarkeit durch Einführung von Disulfidbrücken zu untersuchen. Da bereits die Insertion von Vorstufenproteinen mit intramolekularen Disulfidbrücken in mikrosomale Membranen gehemmt wurde, stellte sich im besonderen die Frage, ob eine Assoziation des Vorstufenproteins mit Mikrosomen unter oxidierenden Bedingungen stattfinden würde und ob der assoziierte Vorläufer nach Wiederherstellung von reduzierenden Bedingungen die weiteren Schritte des Transports durchlaufen könnte. Weiterhin sollte geklärt werden, auf welchen Schritt der für die Gesamtreaktion beobachtete Bedarf an Nukleosidtriphosphaten während des Transports kleiner Vorstufenproteine in Mikrosomen zurückzuführen ist.

3.3.6.1. Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit Mikrosomen bei niedriger Temperatur

Es wurde nun versucht, den Gesamtvorgang des Transports in Einzelschritte zu zerlegen. Dazu sollten die Vorstufenproteine an bestimmten Stadien ihres Weges in die Mikrosomen angehäuft werden.

Kleine Vorstufenproteine wurden in Retikulozytenlysaten synthetisiert und nach Beendigung der Synthese bei niedriger Temperatur (4°C) mit Mikrosomen aus Hundepankreas inkubiert. Diese

wurden anschließend in einem zweistufigen Saccharosegradienten zentrifugiert und nachfolgend aus der Zwischenphase bei der Stufe reisoliert. Dabei wurden mit Mikrosomen assoziierte Vorstufenproteine sowohl von löslichen Vorstufenproteinen im Überstand wie von aggregierten oder mit Ribosomen assoziierten Vorstufenproteinen im Sediment abgetrennt.

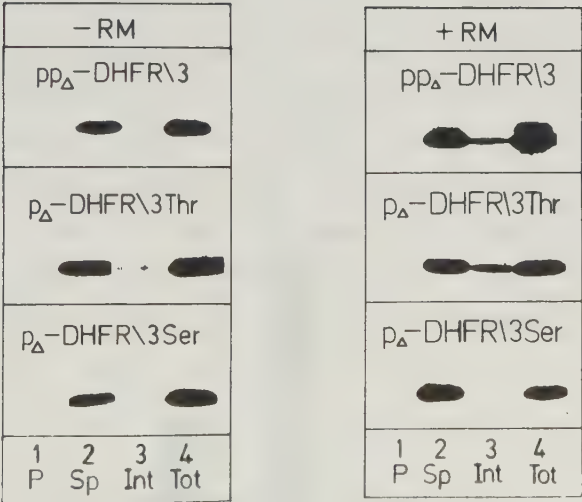
Waren Mikrosomen während der Inkubation der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3 (Abb. 25A; schraffierte Balken) oder p_{Δ} -DHFR/3Thr (Abb. 25A; schwarze Balken) bei niedriger Temperatur anwesend, wurde ein signifikanter Teil des eingesetzten Vorstufenproteins (Abb. 25A; +RM; Tot) in der Zwischenphase angehäuft (Abb. 25A; +RM; Int)(Tab. 1). Nur ein wesentlich geringerer Teil des Vorstufenproteins p_{Δ} -DHFR/3Ser fand sich unter den gleichen Bedingungen in der Zwischenphase des Saccharosegradienten wieder (Abb. 25A; +RM; offene Balken; Int)(Tab. 1). Dieses Vorstufenprotein wird nicht in Mikrosomen transportiert (Abb. 4). Der größte Teil der Vorstufenproteine verblieb löslich im Überstand (Abb. 25A, +RM, Sp)(Tab. 1). Ein kleiner Teil der Vorstufenproteine wanderte durch die beiden Saccharoseschichten (Abb. 25A; +RM; P)(Tab. 1). Die Abwesenheit von Mikrosomen während der Inkubation bei niedriger Temperatur verminderte deutlich die Menge an Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3 und p_{Δ} -DHFR/3Thr, die in der Zwischenphase des Saccharosegradienten wieder aufzufinden war (Abb. 25A; -RM; Int)(Tab. 1). Dagegen hatte dies auf die Verteilung des inaktiven Vorstufenproteins p_{Δ} -DHFR/3Ser innerhalb des Saccharosegradienten keinen nennenswerten Einfluß (Abb. 25A; -RM)(Tab. 1). Vorstufenproteine, die zwei Cysteinreste in ihrem reifen Teil besaßen, verhielten sich ähnlich wie die entsprechenden Vorstufenproteine mit nur einem Cystein (siehe unten).

Dies bedeutet, daß zum Transport befähigte kleine Vorstufen-

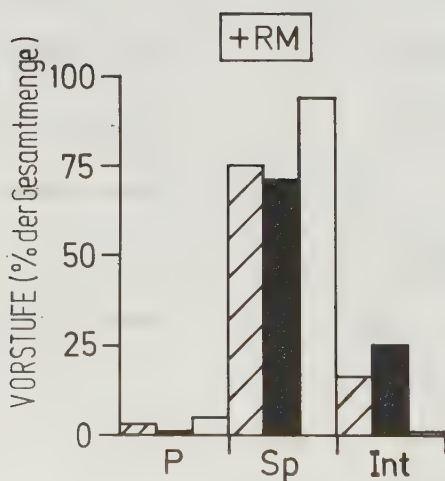
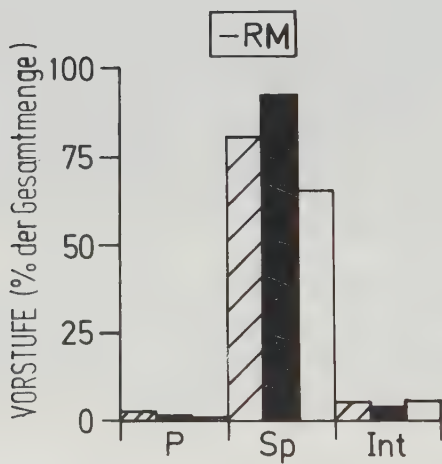
Abb. 25A: Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit der mikrosomalen Membran

A) Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden im Kaninchen-Retikulozytenlysate für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit H₂O (-RM), das andere Aliquot mit Hundepankreas-Mikrosomen (+RM) für 5min bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Proben in zwei Hälften aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit einem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer (Spur 4) verdünnt, das andere Aliquot wurde einem zweistufigen Saccharosegradienten überschichtet (s. *Material und Methoden*). Nach Zentrifugation (Beckman airfuge, Rotor A-100/30, 25psi, 5min) wurde der Gradient in Überstand (Spur 2; Sp), Zwischenphase (Spur 3; Int) und Niederschlag (Spur 1; P) fraktioniert. Überstand und Zwischenphase wurden mit dem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer verdünnt. Der Niederschlag wurde in Probenpuffer aufgenommen. Alle drei Fraktionen des Gradienten und die eingesetzte Gesamtmenge an Vorstufenprotein wurden durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

P, Niederschlag; Sp, Überstand; Int, Zwischenphase; Tot, Gesamtmenge an Vorstufenprotein; -RM, Inkubation in Abwesenheit von Mikrosomen; +RM, Inkubation in Anwesenheit von Mikrosomen; schraffierte Balken beziehen sich auf Vorstufenprotein pp_Δ-DHFR/3, schwarz ausgefüllte Balken auf Vorstufenprotein p_Δ-DHFR/3Thr und offene Balken auf Vorstufenprotein p_Δ-DHFR/3Ser.



Zur quantitativen Auswertung des Fluorogramme wurde ein Densitometer benutzt und die prozentuale Menge an Vorstufenprotein in den einzelnen Fraktionen auf die Gesamtmenge an Vorstufenprotein bezogen, die in den Inkubationen mit oder ohne Mikrosomen eingesetzt worden war (Tab. 1).



proteine bei niedriger Temperatur mit Mikrosomen assoziieren. Da keine Prozessierung der Vorläufer zu beobachten war (Abb. 25A; +RM), werden die weiteren Schritte des Transports, die Insertion des Vorläufers in und der Transfer der reifen Form über die mikrosomale Membran bei niedriger Temperatur verhindert. Der Grund hierfür liegt entweder in einer zu geringen Fluidität der Membranlipide oder in einer reversiblen Inaktivierung von Komponenten des Transportapparates. Der Anteil an Vorstufenprotein, der mit den Mikrosomen assoziierte, lag im Bereich der beobachteten Effizienz des Transports dieser Vorstufenproteine in Mikrosomen. Somit scheint die Membranassoziation der limitierende Schritt des Transports zu sein.

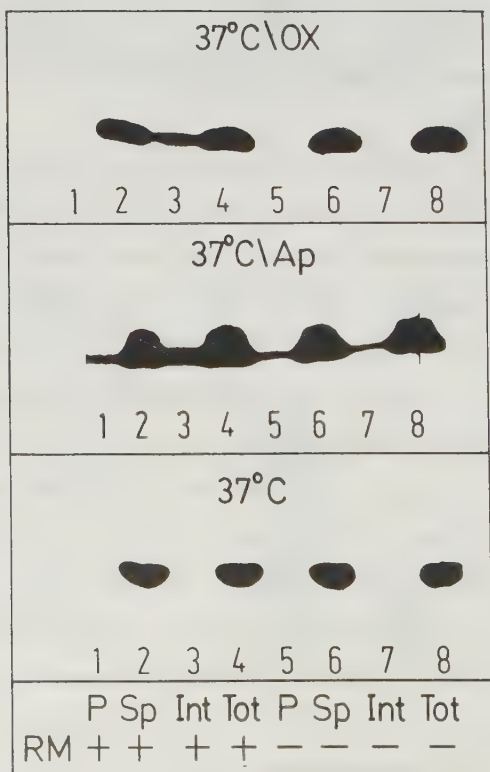
3.3.6.2. Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit Mikrosomen nach Oxidation oder Entfernung von Nukleosidtriphosphaten

Assoziation von Vorstufenproteinen mit Mikrosomen wurde nicht nur durch Inkubation bei niedriger Temperatur erreicht. Oxidation oder Apyrase-Behandlung der Retikulozytenlysate, in denen das Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3^c synthetisiert worden war, verursachten nach Inkubation mit Mikrosomen bei 37°C die Anhäufung eines Teils (5-10% bzw. 10-20%) des eingesetzten Vorstufenproteins in der Zwischenphase des Saccharosegradienten (Abb. 25B; Spur 3). Dieser Anteil war dagegen in Abwesenheit von Mikrosomen deutlich geringer (0,1-1,5% bzw. 0,5-1%) (Abb. 25B; Spur 7). Sowohl Oxidation als auch Entfernung von Nukleosidtriphosphaten verhinderten also die Prozessierung des Vorläufers durch Mikrosomen aus Hundepankreas bei 37°C (Abb. 25B; Spuren 1-4). Ohne Vorbehandlung der Retikulozytenlysate waren bei dieser Temperatur die Verteilungen des Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3^c innerhalb des

Abb. 25B: Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen
mit der mikrosomalen Membran

Mit [^{35}S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurde der Ansatz in drei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Endkonzentration 10mM) (37°C/OX) für 2min bei 20°C inkubiert, das zweite Aliquot wurde mit Apyrase (80U/ml) (37°C/Ap) und das dritte Aliquot mit H_2O (37°C) für 5min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Aliquots in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte erhielt Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 1-4), die andere Hälfte H_2O (Spuren 5-8). Nach Inkubation für 5min bei 37°C wurden alle Proben in zwei Aliquots geteilt und diese entweder direkt (Spuren 4 und 8) oder nach Saccharosegradientenzentrifugation und nachfolgender Fraktionierung (Spuren 1-3 und 5-7), wie unter Abb. 25A beschrieben, durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

37°C/OX, Inkubation bei 37°C unter oxidierenden Bedingungen;
37°C/Ap, Inkubation bei 37°C nach Behandlung mit Apyrase; 37°C,
Inkubation bei 37°C; P, Niederschlag; Sp, Überstand; Int, Zwischenphase; Tot, Gesamtmenge an eingesetztem Vorstufenprotein;
RM, Mikrosomen.



Tab. 1: Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit Mikrosomen bei niedriger Temperatur

		pp Δ -DHFR/3	p Δ -DHFR/3Thr	p Δ -DHFR/3Ser
Vorstufe (% der Gesamtmenge)	RM			
Niederschlag	-	2,5	1,5	1,0
	+	3,0	1,0	4,5
Überstand	-	80,3	92,4	65,2
	+	75,7	71,2	93,9
Zwischenphase	-	5,3	4,5	6,0
	+	16,7	25,8	1,0
Summe	-	88,1	98,4	72,2
	+	95,4	98,0	99,4

Tab. 2: Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit Mikrosomen bei niedriger Temperatur und nachfolgender Transport in Mikrosomen bei erhöhter Temperatur

		pp Δ -DHFR/3 ^c	p Δ -DHFR/3Thr ^c
		unverdünnt	100
% Vorstufe assoziiert mit Mikrosomen at 4°C	1: 5	9,1	21,3
	1:10	1,1	3,1
	1:20	-	-
		unverdünnt	100
% reife Form sequestriert von Mikrosomen nach chase von 4°C auf 37°C	1: 5	61,3	70,8
	1:10	22,5	45,5
	1:20	10,5	24,3
		unverdünnt	100
% reife Form sequestriert von Mikrosomen bei 37°C	1: 5	-	1,8
	1:10	-	-

Saccharosegradienten nach Inkubation in Anwesenheit (Abb. 25B; 1-4) und in Abwesenheit (Abb. 25B; 5-8) von Mikrosomen fast identisch.

Dies war ein erster Hinweis, daß eine Disulfidbrücke innerhalb des reifen Teils von kleinen Vorstufenproteinen oder der Mangel an Nukleosidtriphosphaten im Retikulozytenlysat offenbar mit der Assoziation der Vorstufenproteine mit Mikrosomen zu vereinbaren ist.

3.3.6.3. Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit Mikrosomen bei niedriger Temperatur und nachfolgende Insertion in und Transfer über die mikrosomale Membran bei erhöhter Temperatur

Es war nun zu klären, ob Vorläufer, die bei niedriger Temperatur mit Mikrosomen assoziieren, auf einem wirklichen Zwischenstadium während ihres Weges in die Mikrosomen aufgehalten werden. Dazu wurden nach einer ersten Inkubation bei niedriger Temperatur die mit Mikrosomen assoziierten Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/ 3° und p_{Δ} -DHFR/ 3Thr° aus der Zwischenphase des zweistufigen Saccharosegradienten isoliert. Nach einer zweiten Inkubation bei erhöhter Temperatur wurde dann der Transport in Mikrosomen geprüft. Weiterhin wurde die Empfindlichkeit der zweistufigen Transportreaktion gegenüber Verdünnung analysiert.

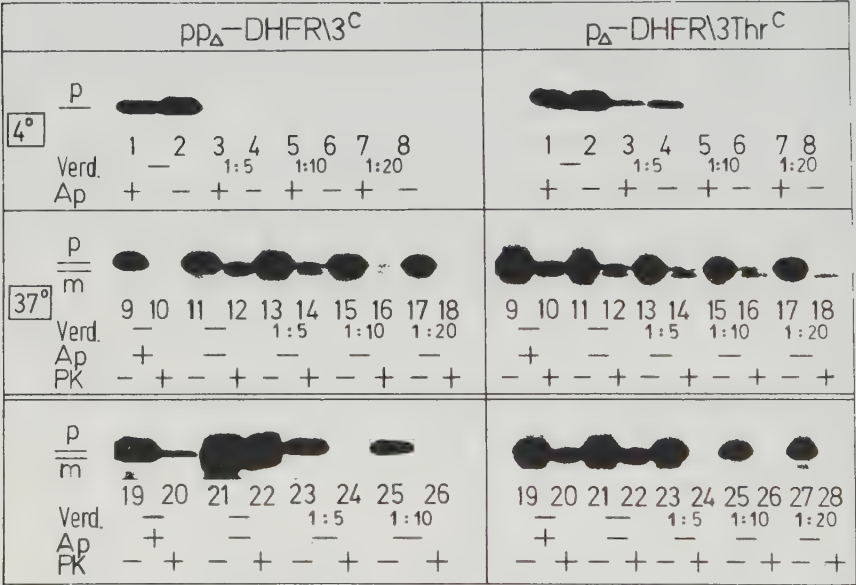
Mikrosomen mit den assoziierten Vorstufenproteinen pp_{Δ} -DHFR/ 3° und p_{Δ} -DHFR/ 3Thr° wurden nach Isolierung aus dem Saccharosegradienten bei 37°C inkubiert. Dies führte zur Prozessierung der Vorläufer und Sequestrierung der reifen Form beider Vorstufenproteine (Abb. 26; Spuren 11 und 12). Die Hemmung der auf die Membranassoziation folgenden Transportschritte durch niedrige Temperatur ist also reversibel. Es wurde nun geklärt, ob während der

Abb. 26: Transport von kleinen, mit mikrosomalen Membranen assoziierten Vorstufenproteinen in Mikrosomen

Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde für 5min bei 37°C mit Apyrase (80U/ml) inkubiert (Spuren 1, 3, 5, 7, 19 und 20), das andere Aliquot mit H₂O (Spuren 2, 4, 6, 8, 21-28). Dann wurden die Proben in vier Aliquots geteilt. Diese Aliquots wurden fünffach verdünnt (Spuren 3, 4, 23 und 24), 10-fach verdünnt (Spuren 5, 6, 25 und 26), 20-fach verdünnt (Spuren 7, 8, 27 und 28) oder wurden nicht verdünnt (Spuren 1, 2, 19-22). Zur Verdünnung wurde Translationsmischung ohne markierte Aminosäuren und ohne in vitro Transkripte benutzt, die entweder mit Apyrase (80U/ml) für 5min bei 37°C vorbehandelt worden war (Spuren 3, 5, 7, 19 und 20) oder nicht mit Apyrase vorbehandelt war (Spuren 4, 6, 8, 21-28). Dann wurden alle Proben mit Hundepankreas-Mikrosomen supplementiert und erneut geteilt. 1/3 jeder Probe wurde für 15min bei 37°C inkubiert, mit dem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer verdünnt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert (Spuren 19-28). 2/3 jeder Probe wurde für 5min bei 4°C inkubiert (erste Inkubation) und nachfolgend auf den zweistufigen Saccharosegradienten geschichtet und zentrifugiert (s. *Material und Methoden*). Nach Fraktionierung des Gradienten wurde 1/12 der abgenommenen Zwischenphase mit dem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer verdünnt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert (Spuren 1-8). 5/6 der Zwischenphasen wurden entweder mit einem Volumen (Spuren 9-12), mit fünf Volumina (Spuren 13 und 14), mit 10 Volumina (Spuren 15 und 16) oder mit 20 Volumina (Spuren 17 und 18) an oben beschriebener, kalter und keine Vorstufenproteine enthaltender Translationsmischung versetzt. Diese war entweder mit Apyrase (80U/ml) für 5min bei 37°C vorbehandelt worden (Spuren 9 und 10) oder war nicht mit Apyrase vorbehandelt worden (Spuren 11-18). Alle Proben wurden für 10min bei 37°C inkubiert (zweite Inkubation) und dann in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K behandelt (Spuren 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 und 28), die andere Hälfte wurde nicht behandelt (Spuren 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 und 27). Nach Fällung mit (NH₄)₂SO₄ wurden alle Proben durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

Eine densitometrische Analyse der Fluorogramme wurde durchgeführt. Die Menge an reifem Protein, das in den verdünnten Transportreaktionen von Mikrosomen sequestriert worden war, wurde auf die Gesamtmenge an reifem und sequestrierten Protein bezogen, welches während der unverdünnten Transportreaktion gebildet worden war (Tab. 2).

p, Vorstufe; m, reife Form; Verd., Verdünnung mit Translationsmischung; Ap, Apyrase; PK, Proteinase K; 4°C erste Inkubation bei 4°C; 37°C erste Inkubation bei 4°C und zweite Inkubation bei 37°C.



zweiten Inkubation freie oder Membran assoziierte Vorstufenproteine in die Mikrosomen transportiert werden. Verdünnung der gesamten Transportreaktion mit "vorstufenfreier" Translationsmischung beeinträchtigte die Prozessierung und Sequestrierung beider Vorstufenproteine durch Mikrosomen (Abb. 26; Spuren 21-28). Fünffache Verdünnung verminderte den nicht in Einzelschritte zerlegten Transport auf unter 2 % (Abb. 26; Spuren 23 und 24)(Tab. 2) im Vergleich zur unverdünnten Reaktion, 10-fache Verdünnung verhinderte ihn völlig (Abb. 26; Spuren 25 und 26)(Tab. 2). Verdünnung der ersten, bei 4°C durchgeführten Inkubation in der zweistufigen Transportreaktion mit "vorstufenfreier" Translationsmischung verursachte eine deutliche Verminderung der Menge an Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c, die mit den Mikrosomen assoziierte. Bei fünffacher Verdünnung assoziierten weniger als 20% (Tab. 2) des Vorstufenproteins im Vergleich zur unverdünnten Reaktion (Abb. 26; Spuren 2 und 4). 20-fache Verdünnung verminderte die Assoziation beider Vorstufenproteine mit Mikrosomen auf unter 1% (Abb. 26; Spuren 5-8)(Tab. 2).

Dagegen führte die Verdünnung der zweiten, bei 37°C durchgeführten Inkubation der zweistufigen Transportreaktion zu einer wesentlich geringeren Herabsetzung der Prozessierung und Sequestrierung beider Vorstufenproteine (Abb. 26; Spuren 13-18), als nach Verdünnung der gesamten Transportreaktion (Abb. 26; Spuren 23-26) beobachtet wurde oder als nach Verdünnung der Assoziationsreaktion die Menge an assoziiertem Vorstufenprotein abnahm (Abb. 26; Spuren 3-8). Nach fünffacher Verdünnung mit "vorstufenfreier" Translationsmischung wurden noch ungefähr 60% (Tab. 2) des in der unverdünnten Reaktion sequestrierten Vorstufenproteins in das Lumen der mikrosomalen Vesikel transportiert

(Abb. 26; Spuren 13 und 14). Sogar 10-fache bzw. 20-fache Verdünnung erlaubte noch Membraninsertion und Membrantransfer mit mindestens 20% bzw. 10% Effizienz im Vergleich zur unverdünnten zweiten Inkubation (Abb. 26; Spuren 15-18)(Tab. 2).

Aus diesen Ergebnissen folgt, daß die Vorstufenproteine bei 4°C in einer Weise mit Mikrosomen assoziiert sind, die ihnen nach Erhöhung der Temperatur auf 37°C die Überquerung der mikrosomalen Membran erlaubt. Da die zweite Inkubation bei 37°C durch Verdünnung in weit geringerem Maß beeinflußt wurde als die Assoziationsreaktion oder der nicht in Einzelschritte gegliederte Transport, scheinen die Vorstufenproteine ohne Freisetzung in die wäßrige Umgebung von der Stelle ihrer Assoziation mit der mikrosomalen Membran in diese inseriert zu werden. Damit befinden sich mit Mikrosomen assoziierte kleine Vorstufenproteine in einem wirklichen Zwischenstadium, d.h. in einer funktionellen Position innerhalb ihres Transportweges in Mikrosomen. Die erste Inkubation in der zweistufigen Transportreaktion spiegelt die Membranassoziation, die zweite Inkubation die Membraninsertion und den Membrantransfer wieder.

3.3.6.4. Bedeutung von Nukleosidtriphosphaten für die Assoziation kleiner Vorstufenproteine mit und Insertion in die mikrosomale Membran

Die Entkoppelung der Membranassoziation von der Membraninsertion ermöglichte die Klärung, welcher der beiden Schritte Nukleosidtriphosphate erfordert. Die während der zweistufigen Transportreaktion gewonnenen Ergebnisse bestätigten den durch Apyrase hemmbaren Transport des Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3°C (Abb. 26; Spuren 19 und 20) und den durch Apyrase kaum beeinflussten Transport des Vorstufenproteins p_{Δ} -DHFR/3Thr°C (Abb. 26, Spuren 19

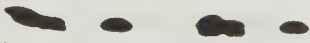
und 20). Darüberhinaus legten sie nahe, daß die Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten während der Inkubation bei niedriger Temperatur die Effizienz der Assoziation beider Vorstufenproteine mit der mikrosomalen Membran nicht beeinflußt (Abb. 26; Spuren 1-8).

Vorstufenproteine wurden mit Mikrosomen in An- oder Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten bei 4°C inkubiert, anschließend aus dem Saccharosegradienten isoliert, in "vorstufenfreier" Translationsmischung aufgenommen und erneut in An- oder Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten bei 37°C inkubiert. Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3^c, das in der nicht in Einzelschritte zerlegten Gesamtreaktion nur in Gegenwart von Nukleosidtriphosphaten in Mikrosomen transportiert wurde, benötigte zur Prozessierung und Sequestrierung durch Mikrosomen in der zweistufigen Transportreaktion Nukleosidtriphosphate nur während der zweiten Inkubation (Abb. 27; Spuren 1-3 und 7-9). Die Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten während der Membranassoziation schien keinen Einfluß auf die Membraninsertion und den Membrantransfer zu haben. Auch nach Apyrase-Behandlung des Retikulozytenlysats vor der ersten Inkubation erfolgte Prozessierung und Sequestrierung dieses Vorstufenproteins, wenn Nukleosidtriphosphate während der zweiten Inkubation vorhanden waren (Abb. 27; Spuren 7-9). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß die Menge an Vorstufenprotein, die mit Mikrosomen assoziiert, nicht von Nukleosidtriphosphaten abhängt (Abb. 26). Dagegen verhinderte die Anwesenheit von Apyrase während der zweiten Inkubation die Prozessierung des NTP-abhängigen Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3^c unabhängig davon, ob Nukleosidtriphosphate während der ersten Inkubation vorhanden waren oder nicht (Abb. 27; Spuren 4-6 und 10-12). Nukleosidtriphosphate sind also nur für die Insertion der Vorläufer in und

Abb. 27: Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit, Insertion in und Transfer über die mikrosomale Membran in Anwesenheit oder Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten

Mit [35 S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit Apyrase (80U/ml) für 5min bei 37°C inkubiert (Spuren 7-12), das andere Aliquot mit H₂O (Spuren 1-6). Alle Proben wurden mit Hundepankreas-Mikrosomen supplementiert, für 5min bei 4°C inkubiert (erste Inkubation) und der zweistufigen Saccharosegradientenzentrifugation (s. *Material und Methoden*) unterworfen. Die Zwischenphasen mit Membran assoziierten Vorstufenproteinen wurden abgenommen und mit einem Volumen an "vorstufenfreier" Translationsmischung ohne radioaktiv markierte Aminosäuren und ohne *in vitro* Transkripte versetzt, die entweder mit Apyrase (80U/ml) für 5min bei 37°C vorbehandelt worden war (Spuren 4-6 und 10-12) oder nicht mit Apyrase vorbehandelt worden war (Spuren 1-3 und 7-9). Nach Inkubation für 15min bei 37°C (zweite Inkubation) wurde jede Probe in drei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit Proteinase K in Abwesenheit von Triton X-100 (Spuren 2, 5, 8 und 11) behandelt, das zweite Aliquot in Anwesenheit von Triton X-100 (Spuren 3, 6, 9 und 12). Das dritte Aliquot wurde nicht mit Proteinase K behandelt (Spuren 1, 4, 7 und 10). Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben mit PMSF (Endkonzentration 1mM) und mit dem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem Puffer versetzt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p. Vorstufe; m. reife Form; 4°C/Ap, erste Inkubation bei 4°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von Apyrase; 37°C/Ap, zweite Inkubation bei 37°C in Anwesenheit oder Abwesenheit von Apyrase; PK, Proteinase K; TX, Triton X-100.

		pp _Δ -DHFR13 ^C												
$\frac{p}{m}$														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
		p _Δ -DHFR13Thr ^C												
$\frac{p}{m}$														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
4°C/Ap		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
37°C/Ap		-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
PK		-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
TX		-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	

möglicherweise auch für den Transfer ihrer reifen Formen über die mikrosomale Membran erforderlich.

Vorstufenprotein p_{Δ} -DHFR/3Thr^c, dessen Transport in der Gesamtreaktion von Nukleosidtriphosphaten kaum beeinflusst wird, zeigte auch während der zweistufigen Transportreaktion eine deutlich geringere Abhängigkeit von Nukleosidtriphosphaten als Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/3^c. Beide Inkubationen konnten ohne wesentliche Verminderung der Prozessierung und Sequestrierung durch Mikrosomen in Gegenwart von Apyrase durchgeführt werden (Abb. 27; Spuren 10-12).

3.3.6.5. Bedeutung des Retikulozytenlysats für die Insertion von kleinen Vorstufenproteinen in die mikrosomale Membran

Es sollte nun geklärt werden, ob das NTP-erfordernde System in den Mikrosomen oder im Retikulozytenlysate oder an beiden Orten lokalisiert ist. Im Falle einer Beschränkung auf das Retikulozytenlysate sollte der unterschiedliche Bedarf an Nukleosidtriphosphaten verschiedener Vorstufenproteine mit einem unterschiedlichen Bedarf an Retikulozytenlysate für ihren Transport in Mikrosomen korrelieren.

Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden Vorstufenproteine im Retikulozytenlysate synthetisiert und mit Mikrosomen bei 4°C inkubiert und daraufhin der zweistufigen Saccharosegradientenzentrifugation unterworfen. Sodann wurden die mit Mikrosomen assoziierten und vom Retikulozytenlysate abgetrennten Vorstufenproteine aus der Zwischenphase isoliert und in An- oder Abwesenheit von Retikulozytenlysate und ATP bei 37°C inkubiert. Prozessierung und Sequestrierung des NTP-abhängigen Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3^c fand nur in Gegenwart von Retikulozytenlysate und ATP während der zweiten Inkubation statt (Abb. 28; Spuren 1

und 2). Die Verwendung eines ATP enthaltenden (Abb. 28; Spuren 5 und 6) oder nicht enthaltenden Puffers (Abb. 28; Spuren 3 und 4) anstelle des Retikulozytenlysats führte zu keiner Prozessierung dieses Vorstufenproteins durch Mikrosomen (Abb. 28; Spuren 3-6). Im Gegensatz dazu wurde das NTP-unabhängige Vorstufenprotein p_{Δ} -DHFR/3Thr^c auch ohne Zugabe von Retikulozytenlysats, d.h. nur in Gegenwart von Puffer, von Mikrosomen prozessiert und sequestriert (Abb. 28; Spuren 3 und 4). Dabei wurde im Vergleich zur Inkubation mit Retikulozytenlysats etwa 50% des Proteins in Mikrosomen transportiert. Die Zugabe von ATP zu diesem Puffer erhöhte die Effizienz der Prozessierung und Sequestrierung auf etwa 80% des Transports in Gegenwart von Retikulozytenlysats (Abb. 28; Spuren 5 und 6).

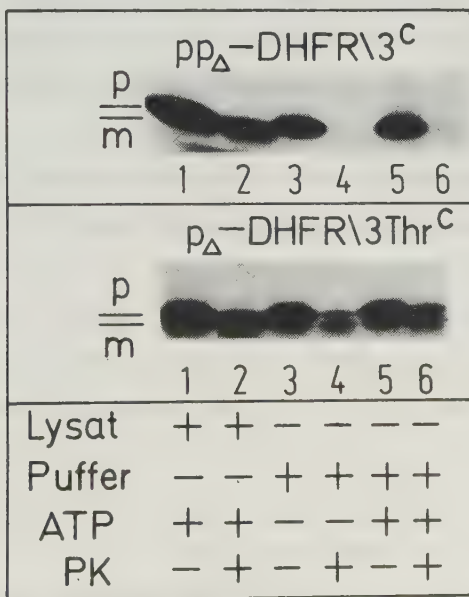
Offensichtlich erfordert der Transport von verschiedenen Vorstufenproteinen die Gegenwart von verschiedenen Mengen an Retikulozytenlysats für die Insertion in die mikrosomale Membran. Dabei korreliert der Bedarf an Nukleosidtriphosphaten des Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3^c mit der Abhängigkeit der Insertionsreaktion von Retikulozytenlysats, während das NTP-unabhängige Vorstufenprotein p_{Δ} -DHFR/3Thr^c für die Insertion kein Lysat benötigt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Insertion auch dieses Vorläufers von einer, wenn auch geringen Menge an Retikulozytenlysats abhängt. Eine Kontamination der Mikrosomen mit Retikulozytenlysats nach Reisolierung aus dem Saccharosegradienten ist möglich. Darüberhinaus wäre auch eine vorübergehende Bindung der NTP-verbrauchenden Komponente(n) an die Membran der Mikrosomen vorstellbar.

Die Nukleosidtriphosphate selbst scheinen keinen direkten Einfluß auf die Vorläufer auszuüben, sondern mögen mit einer Komponente des Retikulozytenlysats in Wechselwirkung treten, um

Abb. 28: Insertion in und Transfer über die mikrosomale Membran von Membran assoziierten kleinen Vorstufenproteinen in An- oder Abwesenheit von Kaninchen-Retikulozytenlysat

Mit [35 S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden für 10min bei 37°C in Kaninchen-Retikulozytenlysaten synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A, gefolgt von Behandlung mit Apyrase für 5min bei 37°C, wurden die Proben mit Hundepankreas-Mikrosomen supplementiert und für 5min bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben auf zweistufige Saccharosegradienten geschichtet und zentrifugiert (s. *Material und Methoden*). Die Phasen zwischen den beiden Saccharoseschichten mit den darin enthaltenen Membran assoziierten Vorstufenproteinen wurden abgenommen und in drei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit in 20mM Hepes/KOH (pH 7,4) gelöstem ATP (Endkonzentration 8mM) und mit dem ursprünglichen, zur Synthese benutzten Volumen an "vorstufenfreier" Translationsmischung versetzt, die keine markierten Aminosäuren und *in vitro* Transkripte enthielt (Spuren 1 und 2). Dem zweiten Aliquot wurde dasselbe Volumen an Puffer (50mM Hepes/KOH pH 7,4; 50mM KAc; 2mM MgAc; 1mM DTT) zugefügt (Spuren 3 und 4). Das dritte Aliquot erhielt zusätzlich zu diesem Puffer ATP (Endkonzentration 8mM) (Spuren 5 und 6). Nach Inkubation für 15min bei 37°C wurde jede Probe in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K (Spuren 2, 4 und 6), die andere Hälfte mit H₂O (Spuren 1, 3 und 5) für 60min bei 0°C inkubiert. Dann wurden alle Proben mit PMSF (Endkonzentration 1mM) versetzt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; Lysat, "vorstufenfreie" Translationsmischung; PK, Proteinase K.



dadurch die Insertion der Vorstufenproteine in die mikrosomale Membran zu ermöglichen.

3.3.6.6. Bedeutung von Nukleosidtriphosphaten für die Prozessierung kleiner Vorstufenproteine durch Leaderpeptidase aus E.coli

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß für die Insertion von kleinen Vorstufenproteinen in die mikrosomale Membran Nukleosidtriphosphate benötigt werden. Der Vorgang der Membraninsertion sollte nun in einem weniger komplexen System näher charakterisiert werden. Die Prozessierung von Vorstufenproteinen durch isolierte Leaderpeptidase aus E.coli (Zwizinski und Wickner, 1980) erfordert die Präsentation der Vorstufenproteine in Detergensmizellen. Vorstufenproteine müssen also vor Prozessierung durch Leaderpeptidase in Detergensmizellen inseriert werden, ähnlich wie sie vor Prozessierung durch die Signalpeptidase in die mikrosomale Membran zu inserieren haben. Unter der Annahme, daß der Vorgang der Insertion von kleinen Vorstufenproteinen in Mikrosomen und in Detergensmizellen Gemeinsamkeiten aufweist (Wiech et al., 1987), stellte sich die Frage, ob verschiedene kleine Vorstufenproteine einen unterschiedlichen Bedarf an Nukleosidtriphosphaten für die Prozessierung durch Leaderpeptidase aus E.coli in Detergens aufweisen.

Die Prozessierung der im Retikulozytenlysat synthetisierten Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3 und p_{Δ} -DHFR/3Thr durch isolierte Leaderpeptidase erfolgte nur in Anwesenheit von Detergens (Abb. 29; Spuren 1 und 2), nicht jedoch in dessen Abwesenheit (Daten nicht gezeigt). Offenbar müssen diese kleinen Vorstufenproteine, ähnlich wie das Plasmamembranprotein M13 Procoat (Ohno-Iwashito et al., 1984; Ohno-Iwashito und Wickner, 1984), zur Prozessierung

durch Leaderpeptidase aus E.coli in Detergensmizellen inseriert vorliegen.

Im Test verhinderte die Behandlung des Retikulozytenlysats mit Apyrase nach Synthese der Vorstufenproteine die Prozessierung des NTP-abhängigen Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3 durch Leaderpeptidase (Abb. 29; Spur 3). Die Prozessierung wurde jedoch durch Zugabe von ATP wiederhergestellt (Abb. 29; Spur 4). Im Gegensatz dazu verminderte die Apyrase-Behandlung die Prozessierung des NTP-unabhängigen Vorstufenproteins p_{Δ} -DHFR/3Thr um nur 10-20% im Vergleich zu fehlender Apyrase-Behandlung (Abb. 29; Spur 3). Die Aktivität der Leaderpeptidase selbst erfordert offenbar keine oder nur sehr geringe Mengen an Nukleosidtriphosphaten.

Damit benötigen verschiedene kleine Vorstufenproteine unterschiedliche Mengen an Nukleosidtriphosphaten sowohl für die Insertion in mikrosomale Membranen als auch für die Insertion in Detergensmizellen. Die Korrelation des Energiebedarfs von verschiedenen Vorstufenproteinen zwischen der Insertion in Mikrosomen und in Detergensmizellen spricht für Gemeinsamkeiten im Mechanismus beider Prozesse. Ferner weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß während des Transports oder genauer während der Insertion kleiner Vorstufenproteine in Mikrosomen Nukleosidtriphosphate über eine Komponente des Retikulozytenlysats und nicht über eine Komponente der mikrosomalen Membran wirken. Das Substrat der NTP-abhängigen Komponente des Retikulozytenlysats scheinen offensichtlich nicht die Mikrosomen, sondern direkt oder indirekt die Vorstufenproteine selbst zu sein.

Abb. 29: Folge der Entfernung von Nukleosidtriphosphaten aus dem Retikulozytenlysats auf die Prozessierung kleiner Vorstufenproteine durch Leaderpeptidase aus E.coli

Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit Apyrase (6U/ml) (Spuren 3 und 4), das andere Aliquot mit H₂O (Spuren 1 und 2) für 5min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde die mit Apyrase behandelte Probe in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde mit ATP (Endkonzentration 6mM) supplementiert (Spur 4), die andere Hälfte, wie auch das nicht mit Apyrase behandelte Aliquot, wurde mit H₂O supplementiert (Spuren 1-3). Alle Ansätze wurden mit Triton X-100 (Endkonzentration 0,5%) versetzt. Das nicht mit Apyrase behandelte Aliquot wurde jetzt in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte erhielt H₂O (Spur 1), die andere Hälfte, wie auch die beiden mit Apyrase behandelten Proben, erhielten E.coli Leaderpeptidase (366µg/ml) (Spuren 2-4). Nach Inkubation für 30min bei 37°C wurden alle Proben mit (NH₄)₂SO₄ (Endkonzentration 66%) gefällt, die Präzipitate in Probenpuffer gelöst und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p. Vorstufe; m. reife Form; LEP, E.coli Leaderpeptidase; Ap, Apyrase.

	pp _Δ -DHFR\3				p _Δ -DHFR\3Thr			
$\frac{p}{m}$								
	1	2	3	4	1	2	3	4
LEP	—	+	+	+	—	+	+	+
Ap	—	—	+	+	—	—	+	+
ATP	—	—	—	+	—	—	—	+

3.3.6.7. Einfluß von Disulfidbrücken innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine auf die Assoziation mit und Insertion in die mikrosomale Membran

Es war nun zu klären, mit welchem Transportschritt die haarnadel-förmige Konformation des reifen Teils der kleinen Vorstufenproteine zu vereinbaren ist.

Die oxidierten und reduzierten Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/ 3° und p_{Δ} -DHFR/3Thr $^{\circ}$ wurden bei 4°C in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten mit Mikrosomen inkubiert und aus der Zwischenphase des zweistufigen Saccharosegradienten isoliert. Die nachfolgende Inkubation bei 37°C mit Retikulozytenlysat in Gegenwart von Nukleosidtriphosphaten wurde unter oxidierenden oder reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Die mit Mikrosomen assoziierten Vorläufer wurden prozessiert und ihre reifen Formen sequestriert, wenn die Inkubation bei 37°C unter reduzierenden Bedingungen erfolgte (Abb. 30; Spuren 3, 4, 7 und 8). Dabei spielte es keine Rolle, ob für die Inkubation bei 4°C oxidierte (Abb. 30; Spuren 7 und 8) oder reduzierte Vorstufenproteine (Abb. 30; Spuren 3 und 4) benutzt worden waren. Oxidierende Bedingungen während der Inkubation bei 37°C verhinderte den Transport der Membran assoziierten Vorstufenproteine in Mikrosomen in jedem Fall (Abb. 30; Spuren 1, 2, 5 und 6). Der in zwei Schritten durchgeführte Transport der nur ein Cystein besitzenden Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3 und p_{Δ} -DHFR/3Thr wurde durch oxidierende Bedingungen weder während der ersten (Abb. 30; Spuren 7 und 8) noch während der zweiten Inkubation (Abb. 30; Spuren 1 und 2) oder während beider Inkubationen (Abb. 30; Spuren 5 und 6) gehemmt.

Offenbar verursachten die oxidierenden Bedingungen während der zweiten Inkubation keine Inaktivierung des Transportapparates.

Abb. 30: Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit, Insertion in und Transfer über die mikrosomale Membran unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen

Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A, gefolgt von Behandlung mit Apyrase (80U/ml) für 5min bei 37°C, wurden die Proben in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 5mM)(Spuren 5-8) für 2min bei 20°C inkubiert, das andere Aliquots mit H₂O (Spuren 1-4). Dann wurden alle Proben mit Hundepankreas-Mikrosomen supplementiert, für 5min bei 4°C inkubiert (erste Inkubation) und der zweistufigen Saccharosegradientenzentrifugation (s. *Material und Methoden*) unterworfen. Hierzu wurde im Falle der K₃Fe(CN)₆ enthaltenden Probe DTT im Gradientenpuffer durch K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 5mM) ersetzt. Die Zwischenphasen wurden abgenommen und mit einem Volumen an "vorstufenfreier" Translationsmischung ohne radioaktiv markierte Aminosäuren und *in vitro* Transkripte versetzt, welche entweder mit K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 10mM)(Spuren 1, 2, 5 und 6) oder mit DTT (Endkonzentration 10mM)(Spuren 3, 4, 7 und 8) für 2min bei 20°C vorbehandelt worden war. Nach Inkubation für 15min bei 37°C (zweite Inkubation) wurde eine Hälfte jeder Probe mit Proteinase K behandelt (Spuren 2, 4, 6 und 8), die andere Hälfte wurde nicht behandelt (Spuren 1, 3, 5 und 7). Alle Proben wurden durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; 4°C/Ox, erste Inkubation bei 4°C unter oxidierenden oder nicht-oxidierenden Bedingungen; 37°C/Ox, zweite Inkubation bei 37°C unter oxidierenden oder nicht-oxidierenden Bedingungen.

	pp _Δ -DHFR\3 ^C								pp _Δ -DHFR\3							
$\frac{p}{m}$																
	p _Δ -DHFR\3Thr ^C								p _Δ -DHFR\3Thr							
$\frac{p}{m}$																
4°C/Ox	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
37°C/Ox	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
PK	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Stattdessen wirkten sie direkt auf die Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c, wahrscheinlich über die Einführung von Disulfidbrücken oder die Aufrechterhaltung von Disulfidbrücken, die bereits vor oder während der ersten Inkubation unter oxidierenden Bedingungen gebildet worden waren.

Transportinkompetente Vorstufenproteine mit nicht balanzierten Ladungen in den terminalen Bereichen ihrer reifen Teile zeigten nach Einführung einer intramolekularen Disulfidbrücke in ihren reifen Teil keine Fähigkeit zur Assoziation mit Mikrosomen (Daten nicht gezeigt).

Offenbar gestatten Disulfidbrücken innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine die Assoziation der Vorstufenproteine mit der mikrosomalen Membran. Sie unterbinden jedoch die Insertion der Vorläufer in und möglicherweise auch den Transfer der reifen Formen über die mikrosomale Membran. Da Disulfidbindungen per se mikrosomale Membranen überqueren können, muß die Ursache für diese Hemmung in der Konformation des reifen Teils zu finden sein.

3.3.6.8. Einfluß von Disulfidbrücken auf die Prozessierung kleiner Vorstufenproteine durch Leaderpeptidase aus E.coli

Aufgrund der Gemeinsamkeiten im Energiebedarf der Insertion von kleinen Vorstufenproteinen in mikrosomale Membranen und in Detergensmizellen, stellte sich die Frage, ob die Einführung einer Disulfidbrücke in den reifen Teil der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c zu einer Hemmung der Prozessierung durch isolierte Leaderpeptidase in Detergens führt, wie sie bereits für die Prozessierung durch intakte Mikrosomen festgestellt worden war.

Beide Vorstufenproteine wurden durch Leaderpeptidase aus

E. coli in Gegenwart von Detergens zum reifen Protein prozessiert. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Detergens bereits während der Synthese (Abb. 31A; Spur 4) oder erst danach (Abb. 31A; Spur 3) anwesend war. Oxidation der Vorstufenproteine verhinderte jedoch ihre Prozessierung durch Leaderpeptidase, als das Detergens erst nach der Synthese zugegeben worden war (Abb. 31; Spur 2). Die Prozessierung des Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3, das nur ein Cystein in seinem reifen Teil enthält, wurde durch Oxidation nicht beeinträchtigt (Abb. 31; Spur 2). Somit lag die Ursache für die hemmende Wirkung der Oxidation nicht in der Inaktivierung der Leaderpeptidase, sondern in Veränderungen der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c selbst. Diese wurden wahrscheinlich durch Einführung der Disulfidbrücken hervorgerufen.

Die Gegenwart von Detergens während der Synthese dieser beiden Vorstufenproteine verhinderte jedoch die Hemmung der Prozessierung durch oxidierende Bedingungen. Beide Vorläufer wurden unter diesen Synthesebedingungen durch Leaderpeptidase aus *E. coli* in ihre reifen Formen überführt (Abb. 31A; Spur 5; Abb. 31B; Spur 6). Es war deshalb zu klären, ob die Disulfidbrücken innerhalb des reifen Teils geschlossen wurden.

Oxydierte Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c, die in Abwesenheit von Detergens synthetisiert worden waren (Abb. 31B; OX, Spuren 1 und 4), wiesen bei der in Abwesenheit von Reduktionsmittel durchgeführten Polyacrylamidgelelektrophorese gegenüber ihren reduzierten Formen (Abb. 31B; OX, Spuren 2 und 5) ein leicht erhöhtes apparentes Molekulargewicht auf. War das Detergens jedoch während der Synthese anwesend, besaßen diese Vorstufenproteine unter oxidierenden Bedingungen im Polyacrylamidgel ohne Reduktionsmittel das gleiche elektrophoretische

Abb. 31A: Wirkung von oxidierenden Bedingungen auf die Prozessierung von Cystein enthaltenden kleinen Vorstufenproteinen durch isolierte Leaderpeptidase aus E.coli

Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C in Abwesenheit von Triton X-100 (Spuren 1-3) oder in Anwesenheit von Triton X-100 (Endkonzentration 0.1%)(Spuren 4 und 5) synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in drei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 10mM) versetzt (Spuren 2 und 5), die beiden anderen Aliquots mit H₂O (Spuren 1, 3 und 4). Alle Proben wurden für 2min bei 20°C inkubiert, sodann auf eine Konzentration an Triton X-100 von 0,5% gebracht und nachfolgend entweder mit H₂O (Spur 1) oder mit isolierter E.coli Leaderpeptidase (366µg/ml)(Spuren 2, 3, 4 und 5) supplementiert. Nach Inkubation für 30min bei 37°C wurden alle Proben mit (NH₄)₂SO₄ (Endkonzentration 66%) gefällt. Die Präzipitate wurden in Probenpuffer gelöst und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; LEP, E.coli Leaderpeptidase; OX, oxidierende Bedingungen nach Synthese; TX, Triton X-100 anwesend während der Synthese.

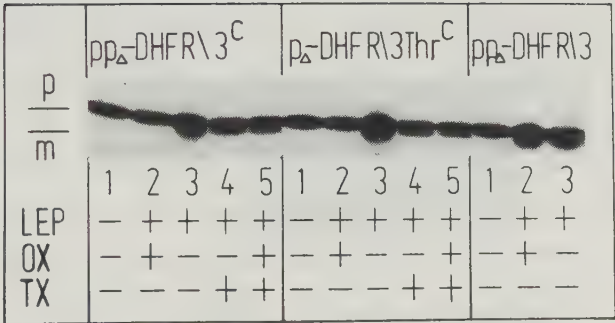
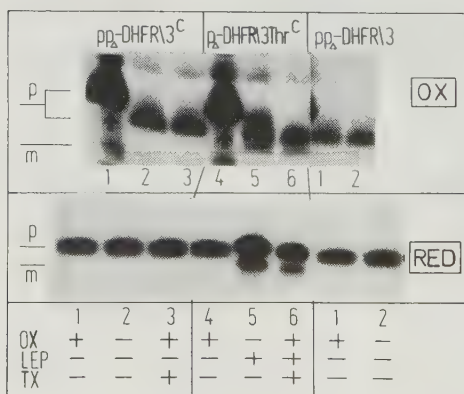


Abb. 31B: Elektrophoretisches Wanderungsverhalten von Cystein enthaltenden Vorstufenproteinen nach Synthese in Gegenwart von Detergens

Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten in Abwesenheit von Triton X-100 (Spuren 1, 2, 4 und 5) oder in Anwesenheit von Triton X-100 (Endkonzentration 0,1%)(Spuren 3 und 6) für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in drei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit H₂O supplementiert (Spuren 2 und 5), die beiden anderen Aliquots wurden mit K₃Fe(CN)₆ (Endkonzentration 10mM) supplementiert (Spuren 3, 4 und 6). Nach Inkubation für 2min bei 20°C wurden alle Proben auf eine Konzentration an Triton X-100 von 0,5% gebracht. Daraufhin erhielten die Proben entweder H₂O (Spuren 1-4) oder E.coli Leaderpeptidase (366µg/ml)(Spuren 5 und 6). Nach Inkubation für 15min bei 37°C wurden alle Proben in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde mit einem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem, Mercaptoethanol enthaltenden Probenpuffer versetzt (RED), die andere Hälfte mit Probenpuffer ohne Mercaptoethanol (OX). Alle Proben wurden durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert. Die Pfeile kennzeichnen eine Verschiebung im apparenten Molekulargewicht der Vorstufen.

p, Vorstufe; m, reife Form; OX, oxidierende Bedingungen nach Synthese; LEP, E.coli Leaderpeptidase; TX, Triton X-100 anwesend während der Synthese; OX, Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen; RED, Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen.



Wanderungsverhalten (Abb. 31B; OX; Spuren 3 und 6), wie es unter reduzierenden Bedingungen beobachtet werden konnte (Abb. 31B; OX; Spuren 2 und 5). Das elektrophoretische Wanderungsverhalten des nur ein Cystein besitzenden Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3 im Polyacrylamidgel ohne Reduktionsmittel unterlag keiner Beeinflussung durch Oxidation (Abb. 31B; OX; Spuren 1 und 2). Auf Reduktionsmittel enthaltenden Gelen besaßen die Vorstufenproteine unter allen Bedingungen dieselbe relative Mobilität (Abb. 31B; RED).

Da eine Erhöhung des apparenten Molekulargewichts mit der Existenz einer Disulfidbrücke innerhalb des reifen Teils der Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/3^c und p_{Δ} -DHFR/3Thr^c korrelierte, lassen diese Ergebnisse den Schluß zu, daß Disulfidbrücken in ihrem reifen Teil nicht geschlossen werden konnten, als die Synthese dieser Proteine in Gegenwart von Detergens erfolgte. Offenbar sind Vorstufenproteine, die bereits während ihrer Synthese in Detergensmizellen inserierten, nicht in der Lage, mit ihrem reifen Teil die Form einer Haarnadel einzunehmen. Eine solche Struktur ist aber Voraussetzung für die Ausbildung einer Disulfidbrücke. Nur in Abwesenheit von Disulfidbrücken erfolgte Prozessierung durch Leaderpeptidase aus E.coli. Dies zeigt, daß Disulfidbrücken innerhalb des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine mit Insertion der Vorstufenproteine in Detergensmizellen nicht vereinbar sind. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich wiederum in der Stabilisierung der "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils.

3.3.7. Die Bedeutung von Nukleosidtriphosphaten für die Konformation kleiner Vorstufenproteine

Der Bedarf an Nukleosidtriphosphaten und die gleichzeitige Not-

wendigkeit von reduzierenden Bedingungen für die Insertion von kleinen Vorstufenproteinen in die mikrosomale Membran legen eine Rolle von Nukleosidtriphosphaten bei der Destabilisierung der "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils vor oder während der Insertion nahe.

3.3.7.1. Einfluß von Nukleosidtriphosphaten auf die Proteasesensitivität kleiner Vorstufenproteine

Es wurde nun versucht, einen ersten Hinweis auf eine NTP-abhängige Konformationsänderung von Vorstufenproteinen zu erhalten. Eine Änderung der Tertiärstruktur von Proteinen sollte in der Regel von einer Änderung der Proteasesensitivität der Proteine begleitet sein. Relative Resistenz gegenüber sogenannten unspezifischen Proteasen (z.B. Proteinase K) kann in einem hohen Grad an Tertiär- oder Quartärstruktur begründet sein (Jaenicke und Rudolph, 1986), während relative Proteasesensitivität für eine eher ungeordnete, weniger kompakte Konformation spricht.

Vorstufenproteine wurden im Kaninchen-Retikulozytenlysat synthetisiert und nach Inkubation mit oder ohne Apyrase mit verschiedenen Mengen an Trypsin bzw. Proteinase K behandelt. Die NTP-abhängigen Vorstufenproteine pp Δ -DHFR/3Ser und pp Δ -DHFR/3 wiesen nach Apyrase-Behandlung des Retikulozytenlysats eine deutlich niedrigere Proteasesensitivität auf (Abb. 32A; Spuren 2 und 4 bzw. 4 und 6; Kreise) als ohne Apyrase-Behandlung (Abb. 32A; Spuren 1 und 3 bzw. 3 und 5; Quadrate). Die Unterschiede im Ausmaß der Proteaseresistenz nach Inkubation ohne zugefügte Proteasen in An- oder Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten waren dagegen nur sehr gering (Abb. 32; Spuren 5 und 6 bzw. 1 und 2). Deshalb läßt sich die in Anwesenheit von Nukleosidtriphosphaten erhöhte Proteasesensitivität dieser Vorstufenproteine nicht

Abb. 32: Folge der Entfernung von Nukleosidtriphosphaten aus dem Retikulozytenlysat auf die Proteasesensitivität von kleinen Vorstufenproteinen

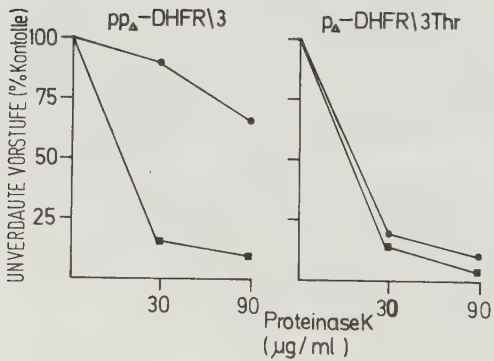
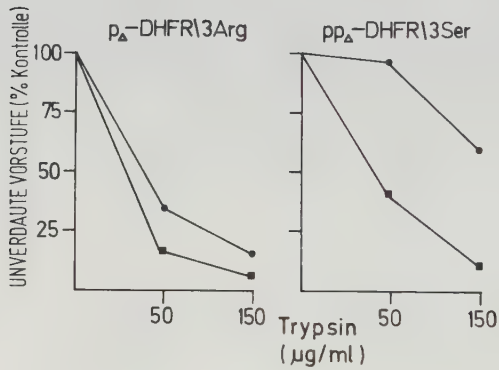
Mit [35 S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in zwei Hälften geteilt. Einer Hälfte wurde Apyrase (80U/ml) (Spuren 2, 4 und 6), der anderen Hälfte H₂O (Spuren 1, 3 und 5) zugefügt. Nach Inkubation für 5min bei 37°C wurden die Proben in drei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde in der Abwesenheit von Trypsin bzw. Proteinase K (100% Kontrollen) inkubiert, die beiden anderen Aliquots wurden im Fall der Vorstufenproteine p Δ -DHFR/3Arg und pp Δ -DHFR/3Ser in Gegenwart von Trypsin (150 oder 50 μ g/ml) (Spuren 1-4) und im Fall der Vorstufenproteine pp Δ -DHFR/3 und p Δ -DHFR/3Thr in Gegenwart von Proteinase K (30 und 90 μ g/ml) (Spuren 3-6) für 60min bei 0°C inkubiert. Daraufhin wurden alle Proben mit PMSF (Endkonzentration 1mM) und mit dem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

Try, Trypsin; Ap, Apyrase; PK, Proteinase K.

	p Δ -DHFR\3Arg						pp Δ -DHFR\3Ser					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Try												
Ap		150		50		—		150		50		—
	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
	pp Δ -DHFR\3						p Δ -DHFR\3Thr					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
PK					30	90					30	90
Ap	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+

Zur quantitativen Auswertung der Fluorogramme wurde ein Densitometer benutzt und der prozentuale Anteil des unverdauten Vorstufenproteins nach Proteasebehandlung auf die Menge an nach der Kontrollinkubation ohne Trypsin bzw. Proteinase K noch vorhandenem Vorstufenprotein (=100%) bezogen.

- (●) unverdautes Vorstufenprotein in Anwesenheit von Apyrase;
- (■) unverdautes Vorstufenprotein in Abwesenheit von Apyrase.



auf die im Retikulozytenlysat vorhandenen ATP-abhängigen Proteasen zurückführen. Dagegen war die Proteasesensitivität des zum Transport in Mikrosomen nicht befähigten Vorstufenproteins P_{Δ} -DHFR/3Arg (Abb. 4) und des NTP-unabhängigen Vorstufenproteins P_{Δ} -DHFR/3Thr in Anwesenheit von Nukleosidtriphosphaten (Abb. 32; Spuren 1 und 3 bzw. 3 und 5; Quadrate) gegenüber Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten (Abb. 32; Spuren 2 und 4 bzw. 4 und 6; Kreise) nicht wesentlich erhöht. Die NTP-abhängige differentielle Proteasesensitivität scheint damit intrinsische Eigenschaften des Vorstufenproteins und nicht eine ATP-Abhängigkeit der zugefügten Proteasen wiederzuspiegeln. Darüberhinaus sind diese Eigenschaften offenbar nur bei Vorstufenproteinen anzutreffen, die zum Transport in Mikrosomen befähigt sind und dazu Nukleosidtriphosphate benötigen.

Die in Gegenwart von Nukleosidtriphosphaten erhöhte Proteasesensitivität von NTP-abhängigen Vorstufenproteinen und die in ihrem Ausmaß damit vergleichbare, von Nukleosidtriphosphaten kaum beeinflusste Proteasesensitivität von NTP-unabhängigen Vorstufenproteinen lassen einen Zusammenhang zwischen einem geringen Grad an Tertiärstruktur und der zur Membraninsertion erforderlichen Konformation dieser Vorstufenproteine vermuten.

3.3.7.2. Einfluß von Disulfidbrücken auf die NTP-abhängige Proteasesensitivität kleiner Vorstufenproteine

Es stellte sich nun die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Bedarf an Nukleosidtriphosphaten und der Notwendigkeit von reduzierenden Bedingungen für die Insertion von kleinen Vorstufenproteinen in die mikrosomale Membran besteht. Dann sollte die relativ proteaseresistente, in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten vorliegende Form des Vorstufenproteins mit seiner durch

Disulfidbrücken gefestigten und mit der Insertion in Mikrosomen unvereinbaren "Haarnadel-Struktur" identisch sein. Aus dieser Struktur könnte nach Öffnen der Disulfidbrücke in Gegenwart von Nukleosidtriphosphaten die relativ proteasesensitive Form des Vorstufenproteins entstehen. In Gegenwart von Detergens synthetisierte Vorstufenproteine würden in An- oder Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten nur diesen Zustand einnehmen.

Zur Überprüfung dieses Denkmodells wurden Vorstufenproteine im Retikulozytenlysate in An- oder Abwesenheit von Detergens synthetisiert und anschließend unter oxidierenden bzw. reduzierenden Bedingungen in An- oder Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten mit verschiedenen Mengen an Protease inkubiert. Die von Nukleosidtriphosphaten kaum beeinflusste Proteasesensitivität des Vorstufenproteins p_{Δ} -DHFR/3Thr^c (Abb. 33A; Spuren 7-9 und 10-12) wurde auch nach Einführung einer Disulfidbrücke in seinen reifen Teil beobachtet (Abb. 33A; Spuren 1-3 und 4-6). Die NTP-abhängige Proteasesensitivität des Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3, welches nur ein Cystein in seinem reifen Teil besitzt, wurde durch oxidierende Bedingungen ebenfalls nicht beeinflusst (Abb. 33A; Spuren 1-6). Offenbar verursachte Oxidation keine Inaktivierung der Apyrase. Dagegen wurde die in Anwesenheit (Abb. 33A; Spuren 10-12) gegenüber der Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten deutlich erhöhte Proteasesensitivität (Abb. 33A; Spuren 7-9) des NTP-abhängigen Vorstufenproteins pp_{Δ} -DHFR/3^c nach Einführung einer Disulfidbrücke in den reifen Teil nicht mehr beobachtet. Sowohl in Anwesenheit (Abb. 33A; Spuren 4-6) als auch in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten (Abb. 33A; Spuren 1-3) zeigte der Vorläufer unter oxidierenden Bedingungen etwa die gleiche relative Resistenz gegenüber Proteinase K wie unter reduzierenden Bedingungen in Abwesenheit von Nukleosidtriphospha-

Abb. 33A: Proteasesensitivität von oxidierten und reduzierten Vorstufenproteinen in Anwesenheit oder Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten

Mit [35 S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 10min bei 37°C synthetisiert. Nach Zugabe von Cycloheximid und RNase A wurden die Proben in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit $K_3Fe(CN)_6$ (Endkonzentration 10mM) supplementiert (Spuren 1-6), das andere Aliquot mit H_2O (Spuren 7-12). Nach Inkubation für 2min bei 20°C wurden die Aliquots in zwei Hälften aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit Apyrase (80U/ml) für 5min bei 37°C inkubiert (Spuren 1-3, 7-9), die andere Hälfte mit H_2O (Spuren 4-6, 10-12). Dann wurde jede Hälfte in drei Aliquots geteilt. Die Aliquots wurden mit H_2O (Spuren 1, 4, 7 und 10) oder mit 30µg/ml Proteinase K (Spuren 2, 5, 8 und 11) oder mit 90µg/ml Proteinase K (Spuren 3, 6, 9 und 12) versetzt. Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben auf 1mM PMSF eingestellt, mit dem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem Puffer verdünnt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

OX, Oxidation; Ap, Apyrase; PK, Proteinase K;

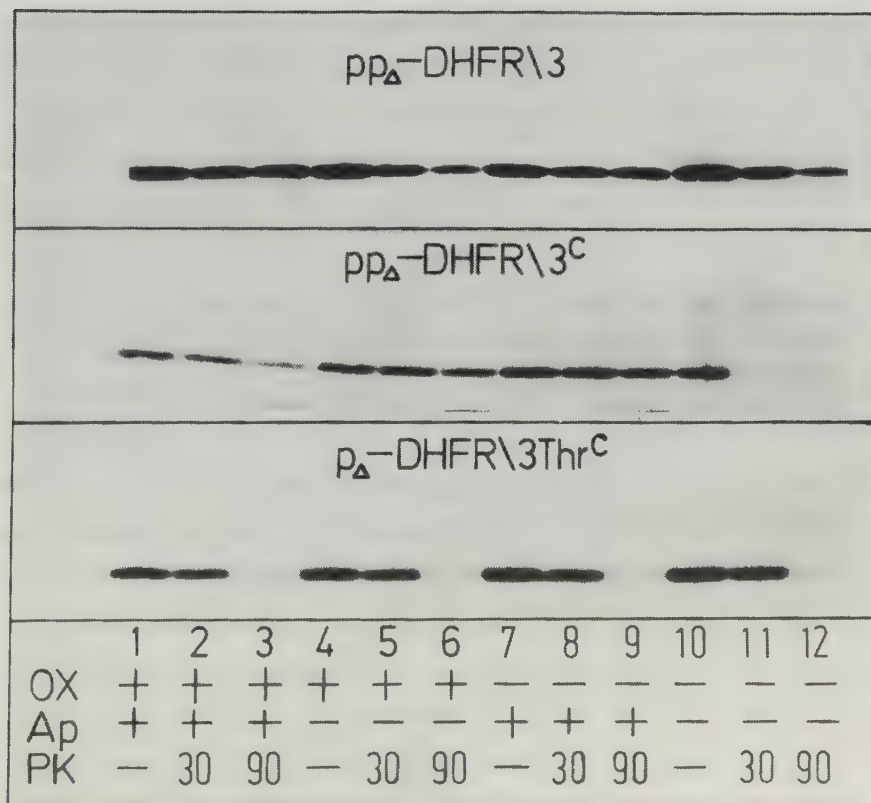
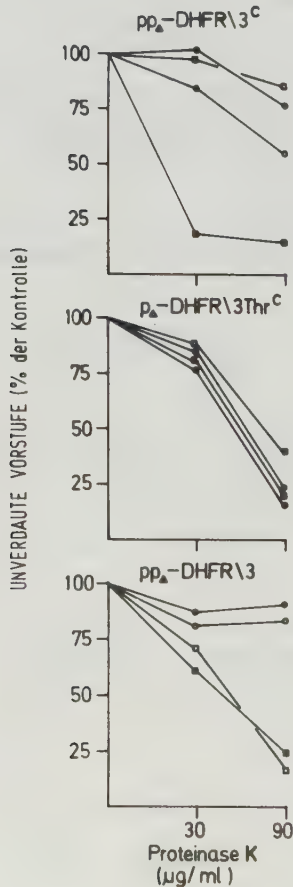


Abb. 33B: Einfluß der Anwesenheit von Detergens während der Synthese auf die Proteasesensitivität kleiner Vorstufenproteine

Mit [35 S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulum-zytenlysaten in Gegenwart von Triton X-100 (Endkonzentration 0,1%) für 10min bei 37°C synthetisiert. Das weitere Vorgehen entspricht dem in Abb. 32 beschriebenen Experiment mit der Ausnahme, daß alle Proben vor der Gelelektrophorese mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Endkonzentration 66%) gefällt und die Präzipitate in einfach konzentriertem Probenpuffer gelöst wurden. Es wird nur die quantitative Auswertung der Fluorogramme durch Densitometrie gezeigt.

(●) unverdautes Vorstufenprotein unter nicht oxidierenden Bedingungen in Anwesenheit von Apyrase; (○) unverdautes Vorstufenprotein unter oxidierenden Bedingungen in Anwesenheit von Apyrase; (■) unverdautes Vorstufenprotein unter nicht oxidierenden Bedingungen in Abwesenheit von Apyrase; (□) unverdautes Vorstufenprotein unter oxidierenden Bedingungen in Abwesenheit von Apyrase.



ten (Abb. 33A; Spuren 7-9).

Waren die Vorstufenproteine jedoch in Gegenwart von Detergens synthetisiert worden, wiesen sie unter reduzierenden wie oxidierenden Bedingungen, in Anwesenheit wie Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten kaum voneinander unterscheidbare Resistenzeigenschaften gegenüber Proteinase K auf (Abb. 33B). Die relative Proteaseresistenz der in Gegenwart von Detergens synthetisierten Vorstufenproteine war dabei etwa genauso groß wie bei in Abwesenheit von Detergens synthetisiertem Vorstufenprotein unter reduzierenden Bedingungen in Anwesenheit von Nukleosidtriphosphaten (Abb. 33A; Spuren 10-12).

Diese Ergebnisse legen nahe, daß die in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten vorliegenden, relativ proteaseresistenten kleinen Vorstufenproteine im reifen Teil die Form einer Haarnadel aufweisen. Stabilisierung dieser "Haarnadel-Struktur" durch Einführung einer Disulfidbrücke verhindert ihre NTP-abhängige Überführung in die relativ proteasesensitive Form.

3.4. Untersuchungen zur Konformation von SRP/Dockingprotein-abhängigen Vorstufenproteinen während des Transports in Mikrosomen

Es sollten nun Aussagen über die Konformation von SRP/Dockingprotein-abhängigen aus Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase bestehenden Hybridproteinen während ihres Transports in Mikrosomen gewonnen werden. Dazu wurden Untersuchungen zum Transportverhalten dieser Hybridproteine unter posttranslationalen Versuchsbedingungen und in Gegenwart eines Liganden der Dihydrofolatreduktase durchgeführt.

3.4.1. Vollständig synthetisierte große Vorstufenproteine und Transport in Mikrosomen

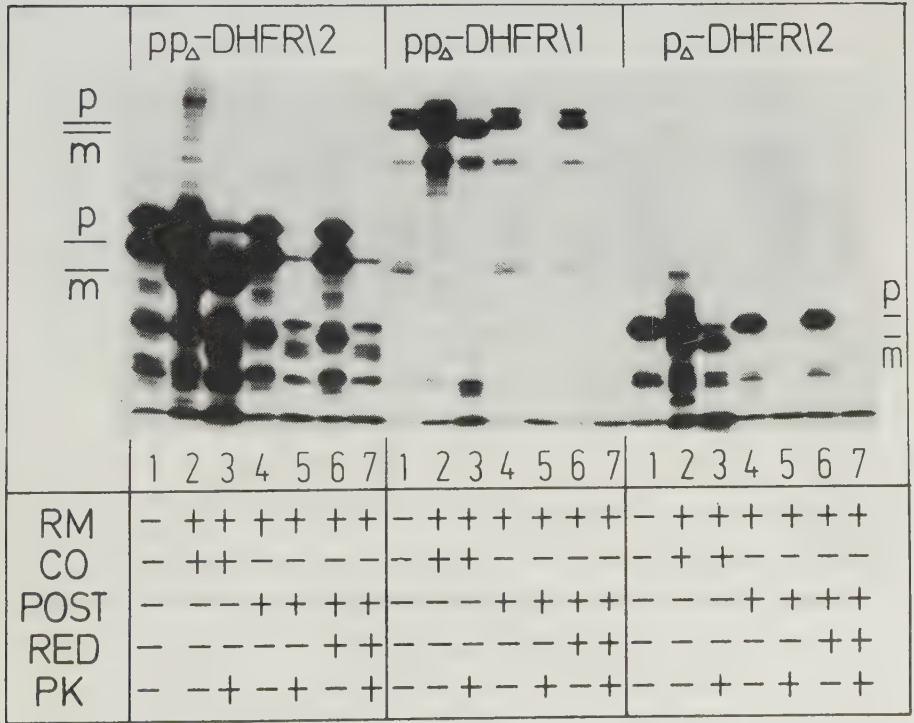
Das Vorstufenprotein pp_{Δ} -DHFR/1 aus der Gruppe der Hybridproteine mit einem Molekulargewicht $>20\text{kD}$ sowie die Vorstufenproteine pp_{Δ} -DHFR/2 und p_{Δ} -DHFR/2 aus der Gruppe der Hybridproteine mit einem Molekulargewicht um 12kD wurden in Mikrosomen transportiert (Abb. 34A; Spuren 2 und 3), als die Mikrosomen während der Synthese anwesend waren. Unter posttranslationalen Bedingungen, die mit dem Transport von kleinen Vorstufenproteinen vereinbar sind, erfolgte jedoch keine Prozessierung (Abb. 34A; Spuren 4 und 5) der von SRP und Dockingprotein abhängigen Hybridproteine. Dies änderte sich auch nicht nach Zugabe von Reduktionsmittel (Abb. 34; Spuren 6 und 7). Der posttranslationale Transport des sekretorischen Proteins Preprolaktin in Mikrosomen aus Hundepankreas wurde durch derartige Behandlung ermöglicht (Maher und Singer, 1986).

Da die Wahrscheinlichkeit der Exposition von den Transport störenden Strukturen innerhalb der Polypeptidkette mit der Größe des Proteins zunimmt, wurde das kleinste SRP/Dockingprotein-abhängige Vorstufenprotein (pp_{Δ} -DHFR/2) auf posttranslationalen Transport in Mikrosomen untersucht. Dabei war eine von der Menge an eingesetzten Mikrosomen abhängige Prozessierung, jedoch mit deutlich geringerer Effizienz (Abb. 34B; Spuren 5 und 7) als unter cotranslationalen Versuchsbedingungen (Abb. 34B; Spuren 3) zu beobachten. Zudem erfolgte keine Sequestrierung der reifen Form durch Mikrosomen (Abb. 34B; Spuren 6 und 8). Behandlung des Retikulozytenlysats mit Apyrase verminderte die Prozessierung dieses Vorstufenproteins (Abb. 34B; Spur 9). Zugabe von ATP zum mit Apyrase behandelten Retikulozytenlysat erlaubte posttranslationale Prozessierung mit der Effizienz, wie sie vor Apy-

Abb. 34: Transport von großen Vorstufenproteinen in Mikrosomen unter cotranslationalen und posttranslationalen Bedingungen

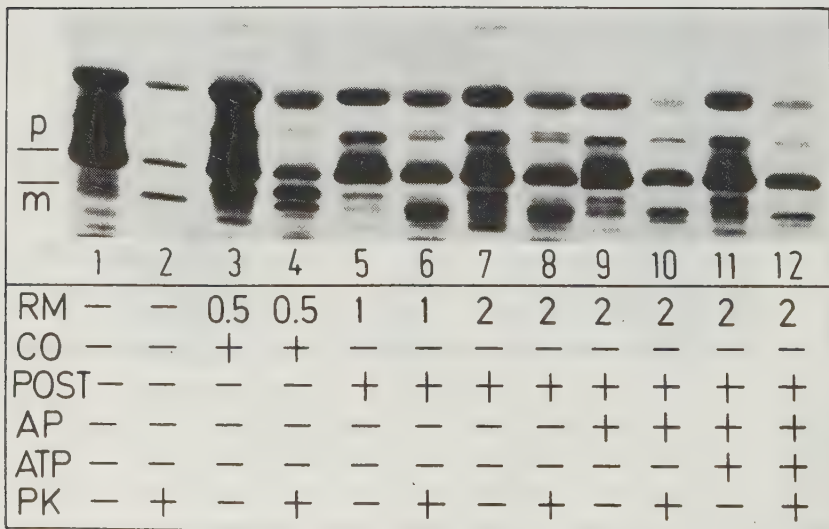
A) Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen für 30min bei 37°C (Spuren 2 und 3) oder in Abwesenheit von Membranen für 30min bei 37°C (Spur 1) oder in Abwesenheit von Membranen für 10min bei 37°C (Spuren 4-7) synthetisiert. Die Ansätze wurde sodann geteilt, eine Hälfte wurde mit DTT (Endkonzentration 20mM)(Spuren 6 und 7), die andere Hälfte mit H₂O (Spuren 1-5) versetzt. Der Ansatz, der bisher noch keine Membranen enthielt und für 10min inkubiert worden war, wurde jetzt mit Hundepankreas-Mikrosomen supplementiert (Spuren 4-7) Die Inkubation wurde für 15min bei 37°C fortgesetzt. Alle Proben wurden sodann in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit Proteinase K behandelt (Spuren 3, 5 und 7), das andere Aliquot wurde ohne Proteinase K behandelt (Spuren 1, 2, 4 und 6). Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben mit PMSF (Endkonzentration 1mM) versetzt und zentrifugiert (Beckman airfuge, Rotor A-100/30, 5min, 25psi). Die Niederschläge wurden in Probenpuffer gelöst und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; CO, cotranslationale Transportbedingungen; POST, posttranslationale Transportbedingungen; RED, reduzierende Bedingungen; PK, Proteinase K.



B) Mit [35 S]Methionin markiertes Vorstufenprotein pp- Δ DHFR/2 wurde in Kaninchen-Retikulozytenlysaten in Gegenwart von Hundepankreas-Mikrosomen für 30min bei 37°C synthetisiert (Spuren 3 und 4) oder wurde im fünffachen Volumen in Abwesenheit von Membranen für 10min bei 37°C synthetisiert (Spuren 1, 2, 5-12). Dieser Ansatz wurde in fünf Aliquots geteilt. Zwei Aliquots wurden mit Apyrase (6U/ml) für 5min bei 37°C behandelt (Spuren 9-12). Das eine dieser beiden Aliquots erhielt sodann in 20mM Hepes/KOH (pH 7,4) gelöstes ATP (Endkonzentration 8mM) (Spuren 11 und 12), das andere Aliquot nur H₂O (Spuren 9 und 10). Diese beiden Aliquots, wie auch ein nicht mit Apyrase behandeltes Aliquot (Spuren 7 und 8), wurden mit 2 μ l Hundepankreas-Mikrosomen supplementiert (Spuren 7-12), während den beiden übrigen nicht mit Apyrase behandelten Aliquots entweder 1 μ l Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 5 und 6) oder H₂O zugefügt wurde (Spuren 1 und 2). Nach Inkubation für 15min bei 37°C wurden alle Proben in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde für 60min bei 0°C mit Proteinase K inkubiert (Spuren 2, 4, 6, 8, 10 und 12), die andere Hälfte mit H₂O (Spuren 1, 3, 5, 7, 9 und 11). Alle Proben wurden mit PMSF (Endkonzentration 1mM) versetzt und zentrifugiert (Beckman airfuge, Rotor A-100/30, 25psi, 5min). Die Niederschläge wurden in Probenpuffer aufgenommen und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; RM, Mikrosomen; CO, co-translationale Transportbedingungen; POST, posttranslationale Transportbedingungen; Ap, Apyrase; PK, Proteinase K.



rase-Behandlung anzutreffen war (Abb. 34B; Spur 11).

Es bleibt offen, ob die beobachtete Prozessierung auf invertierte mikrosomale Vesikel oder auf Insertion in die Membran von nicht mehr geschlossenen mikrosomalen Vesikeln zurückzuführen ist. In jedem Fall läßt sich feststellen, daß unter Bedingungen, die sich für den posttranslationalen Transport von kleinen Vorstufenproteinen eignen, die Insertion von großen, d.h. SRP/Dockingprotein-abhängigen Vorstufenproteinen in Mikrosomen aus Hundepankreas nur mit sehr geringer Effizienz oder überhaupt nicht möglich ist.

3.4.2. Einfluß eines Liganden auf den Transport von großen Vorstufenproteinen in Mikrosomen

Nun wurde untersucht, ob die Konformation für den Transport der großen Vorstufenproteinen in Mikrosomen eine vergleichbar bedeutende Rolle spielt wie bei den kleinen Vorstufenproteinen. In einem solchen Falle sollte die Stabilisierung einer Domäne durch die Bindung eines Liganden, d.h. die Ausbildung einer stabilisierten Tertiärstruktur, den Transport großer Vorstufenproteine in Mikrosomen in analoger Weise negativ beeinflussen.

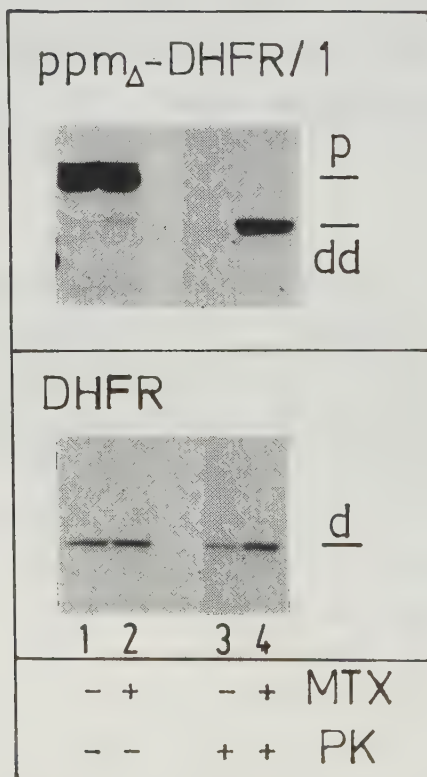
3.4.2.1. Bindung von Methotrexat an Hybridproteine zwischen Promelittin und Dihydrofolatreduktase

Die Dihydrofolatreduktase der Maus und die großen Hybridproteine ppm-DHFR/1 und ppm Δ -DHFR/1, welche als "Passagierprotein" die vollständige Dihydrofolatreduktase enthalten, wurden in An- oder Abwesenheit des Substratanalogons Methotrexat im Retikulozytenlysat synthetisiert und nach Beendigung der Translation mit Protease inkubiert. Dabei zeigte die Dihydrofolatreduktase in Anwesenheit von Methotrexat (Abb. 35; Spuren 2 und 4) eine deutlich

Abb. 35: Proteasesensitivität von Dihydrofolatreduktase und Hybridproteinen in Abwesenheit oder Anwesenheit von Methotrexat

Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten für 30min bei 37°C in Anwesenheit von Methotrexat (100µM) (Spuren 2 und 4) oder in Abwesenheit von Methotrexat (Spuren 1 und 3) synthetisiert. Die Proben wurden in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde in Abwesenheit von Proteinase K (Spuren 1 und 2), das andere Aliquot in Anwesenheit von Proteinase K (50µg/ml) (Spuren 3 und 4) für 60min bei 0°C inkubiert. Daraufhin wurden alle Proben mit PMSF und demselben Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; dd, proteaseresistente Domäne der Dihydrofolatreduktase; d, Dihydrofolatreduktase; MTX, Methotrexat; PK, Proteinase K.



höhere Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau als in Abwesenheit von Methotrexat (Abb. 35; Spuren 1 und 3). Die Hybridproteine wurde in Anwesenheit von Methotrexat durch Protease zu einem Fragment mit Molekulargewicht von ungefähr 20kD abgedaut. Dieses entspricht offenbar der relativ umfangreichen proteaseresistenten Domäne, die die Dihydrofolatreduktase ausmacht (Abb. 35, Spur 4; Abb. 36B; Spuren 5 und 6). In Abwesenheit von Methotrexat waren die Hybridproteine dagegen für die Proteinase K vollständig zugänglich (Abb. 35; Spur 3; Abb. 36B; Spuren 2 und 3). Ein Hybridprotein, das lediglich ein großes carboxyterminales Fragment der Dihydrofolatreduktase besitzt ($pp\Delta_{DHFR/1}$), wurde dagegen auch in Gegenwart von Methotrexat durch Protease völlig verdaut (Daten nicht gezeigt).

Offensichtlich ist Methotrexat in der Lage als Ligand an in vitro synthetisierte Dihydrofolatreduktase oder Hybridproteine zu binden, welche die vollständige Dihydrofolatreduktase enthalten. Die dabei hervorgerufene Konformationsstabilisierung führt zu einer relativ proteaseresistenten Domäne innerhalb des Dihydrofolatreduktaseanteils. Die von Prepromelittin abgeleiteten Teile des Hybridproteins bleiben von der kompakten Struktur der Dihydrofolatreduktase ausgeschlossen und sind weiterhin der Protease zugänglich. Relative Proteaseresistenz wurde deshalb als Kriterium für Bindung des Liganden Methotrexat an die Domäne der Dihydrofolatreduktase benutzt.

3.4.2.2. Transport von Hybridproteinen zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase in Mikrosomen in Gegenwart von Methotrexat

Die Vorstufenproteine $ppm\Delta_{DHFR/1}$ und $ppm_{DHFR/1}$, die beide die vollständige Dihydrofolatreduktase enthalten und in Abwesenheit

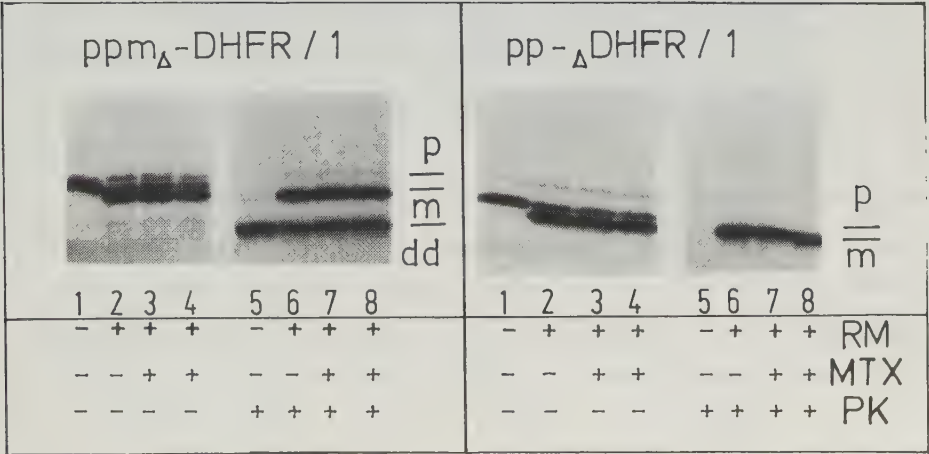
von Mikrosomen Methotrexat binden, sowie das Vorstufenprotein $\text{ppm}_{\Delta}\text{DHFR}/1$, welches nur ein carboxyterminales Fragment der Dihydrofolatreduktase und deshalb keine Fähigkeit zur Bindung von Methotrexat besitzt, wurden im Retikulozytenlysat in An- oder Abwesenheit von Mikrosomen in An- oder Abwesenheit von Methotrexat synthetisiert und anschließend einem Proteaseverdau unterzogen. Alle drei Vorstufenproteine wurden sowohl in Abwesenheit von Methotrexat (Abb. 36A; Spuren 2 und 6; Abb. 36B; Spuren 7-9) als auch in Anwesenheit von Methotrexat (Abb. 36A; Spuren 3, 4, 7 und 8; Abb. 36B; Spuren 10-15) von Mikrosomen prozessiert (Abb. 36A; Spuren 2-4; Abb. 36B; Spuren 7, 10 und 13) und ihre reifen Formen sequestriert (Abb. 36A; 6-8; Abb. 36B; Spuren 8, 11 und 14). Nach Proteaseverdau war im Fall der in Gegenwart von Methotrexat synthetisierten Hybridproteine $\text{ppm-DHFR}/1$ und $\text{ppm}_{\Delta}\text{-DFHFR}/1$ neben der jeweils reifen Form das relativ proteaseresistente Fragment der Dihydrofolatreduktase nachzuweisen (Abb. 36A; Spuren 7 und 8; Abb. 36B; Spuren 5, 6, 11, 12, 14 und 15). Dieses wurde wahrscheinlich aus dem Methotrexat gebundenen Vorläufer freigesetzt, da in Gegenwart von Detergens die reife Form, aber nicht das proteaseresistente Fragment des Hybridproteins $\text{ppm-DHFR}/1$ durch Protease vollständig verdaut wurde (Abb. 36B; Spuren 12 und 15).

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die Hybridproteine $\text{ppm}_{\Delta}\text{-DHFR}/1$ und $\text{ppm-DHFR}/1$ in der Lage waren, den Liganden Methotrexat zu binden, als ihre Synthese in Abwesenheit von Mikrosomen durchgeführt wurde, jedoch nur zum Teil, als ihre Synthese in Anwesenheit von Mikrosomen erfolgte. Das erklärt, weshalb Methotrexat den Transport dieser Hybridproteine in Mikrosomen nicht verhinderte. Offenbar hat Methotrexat während Synthese und gleichzeitigem Transport dieser Hybridproteine keine

Abb. 36: Transport von Hybridproteinen zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase in Mikrosomen in Gegenwart von Methotrexat

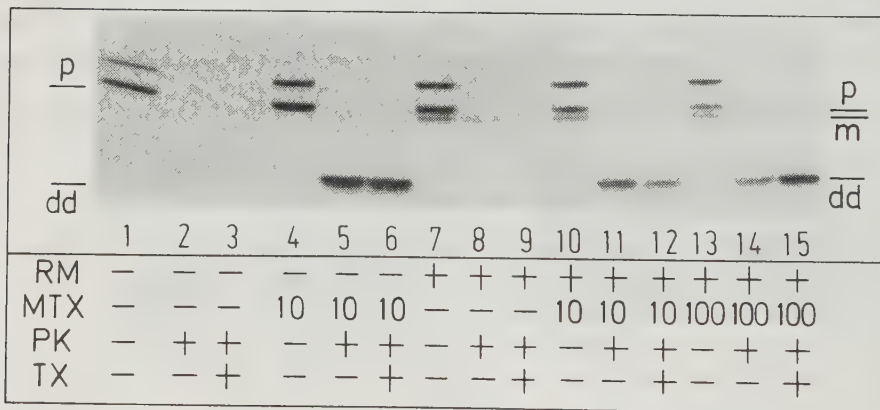
A) Mit [³⁵S]Methionin markierte Vorstufenproteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysaten in Abwesenheit von Methotrexat (Spuren 1, 2, 5 und 6) oder in Anwesenheit von 10µM Methotrexat (Spur 3 und 7) bzw. 100µM Methotrexat (Spur 4 und 8) in Abwesenheit von Membranen (Spuren 1 und 5) oder in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 2-4 und 6-8) synthetisiert. Nach Inkubation für 30min bei 37°C wurde jede Probe in zwei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde in Abwesenheit von Proteinase K (Spuren 1-4), das andere Aliquot in Anwesenheit von Proteinase K (50µg/ml) (Spuren 5-8) für 60min bei 0°C inkubiert. Alle Proben wurden mit PMSF und mit dem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; dd, proteaseresistente Domäne der Dihydrofolatreduktase; RM, Mikrosomen; MTX, Methotrexat; PK, Proteinase K.



B) Mit [35 S]Methionin markiertes Vorstufenprotein ppm-DHFR/1 wurde in Kaninchen-Retikulozytenlysaten in Abwesenheit von Membranen (Spuren 1-6) oder in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 7-15) in Abwesenheit von Methotrexat (Spuren 1-3 und 7-9) oder in Anwesenheit von 10 μ M Methotrexat (Spuren 4-6 und 10-12) bzw. 100 μ M Methotrexat (Spuren 13-15) synthetisiert. Nach Inkubation für 30min bei 37°C wurden die Proben in drei Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde mit Proteinase K (50 μ g/ml) in Abwesenheit von Triton X-100 behandelt (Spuren 2, 5, 8, 11 und 14), ein Aliquot mit Proteinase K in Anwesenheit von Triton X-100 (Endkonzentration 0,5%) (Spuren 3, 6, 9, 12 und 15) und ein weiteres Aliquot wurde nicht mit Proteinase K behandelt (Spuren 1, 4, 7, 10 und 13). Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben mit PMSF und mit dem gleichen Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorstufe; m, reife Form; dd, proteaseresistente Domäne der Dihydrofolatreduktase; RM, Mikrosomen; MTX, Methotrexat; PK, Proteinase K; TX, Triton X-100.



Gelegenheit, die Substrat bindende Domäne der Dihydrofolatreduktase zu erreichen. Diese scheint entweder im Ribosom verborgen zu bleiben oder sich innerhalb des Ribosoms gar nicht erst auszubilden. Diese Ergebnisse deuten auf eine wesentliche Beteiligung der Ribosomen am Transport von großen Vorstufenproteinen in Mikrosomen hin.

3.4.3. Transport von Ribosomen assoziierten großen Vorstufenproteinen in Mikrosomen

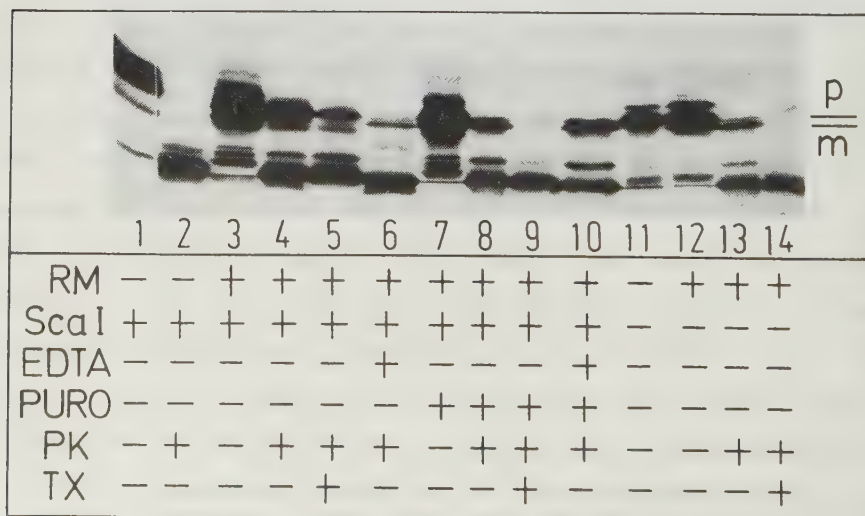
Aufgrund der vermuteten Bedeutung des Ribosoms für den Transport von großen Vorstufenproteinen in Mikrosomen wurden mit Ribosomen assoziierte Vorstufenproteine hergestellt und ihr Verhalten in Gegenwart von Mikrosomen untersucht.

Dazu wurde das für Vorstufenprotein ppm Δ -DHFR/1 kodierende Plasmid im kodierenden Bereich mit dem Restriktionsenzym ScaI geschnitten und anschließend in vitro transkribiert und translatiert. Die auf diese Weise im Retikulozytenlysat hergestellte Peptidyl-tRNS (Abb. 37; Spur 1) besaß den Proteinanteil des Vorstufenproteins ppm Δ -DHFR/2 mit einem Molekulargewicht von ~11kD (Abb. 37; Spur 11). Erzeugung der Peptidyl-tRNS in Gegenwart von Mikrosomen führte zum Auftreten einer geringen Menge an reifer Form (Abb. 37; Spur 3), die vor Abbau durch zugesetzte Proteinase K durch die mikrosomale Membran geschützt war (Abb. 37; Spuren 4 und 5). Gleichzeitig wies unter diesen Bedingungen ein großer Teil der nicht prozessierten Peptidyl-tRNS eine deutlich erhöhte Proteaseresistenz auf (Abb. 37; Spur 5). Diese ließ sich jedoch nicht auf Sequestrierung durch mikrosomale Vesikel zurückführen, wie die Resistenz der "Vorläufer"-Peptidyl-tRNS gegenüber proteolytischem Abbau in Gegenwart von Detergens zeigte (Abbau 37; Spur 5). Sie wurde wahrscheinlich durch

Abb. 37: Peptidyl-tRNS von großen Vorstufenproteinen und Transport in Mikrosomen aus Hundepankreas

Mit [35 S]Methionin markiertes Vorstufenprotein ppm Δ -DHFR/1 wurde für 30min bei 37°C in Abwesenheit von Membranen (Spuren 1, 2 und 11) oder in Anwesenheit von Hundepankreas-Mikrosomen (Spuren 3-10 und 12-14) in Kaninchen-Retikulozytenlysaten synthetisiert, welche entweder in vitro Transkripte von dem entsprechenden, mit Restriktionsenzym ScaI geschnittenen Plasmid enthielten (Spuren 1-10) oder in vitro Transkripte von dem ungeschnittenen Plasmid (Spuren 11-14). Die linearisierten Plasmide wurden vor der in vitro Transkription durch Extraktionen mit Phenol/Chloroform, Chloroform und Äther gereinigt und mit Ethanol gefällt. Die mit geschnittenem Plasmid programmierte und mit Mikrosomen supplementierte Synthesereaktion wurde 15min nach Beginn der Inkubation in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte erhielt Puromycin (Endkonzentration 2,5mM) (Spuren 7-10), die andere Hälfte, wie alle anderen Ansätze, H₂O (Spuren 1-6, 11-14). Die Inkubation wurde für 15min bei 37°C fortgesetzt. Sodann wurden die beiden Hälften, ebenso wie die ungeschnittenes Plasmid enthaltenden Ansätze und die geschnittenes Plasmid, aber keine Mikrosomen enthaltenden Ansätze, in vier Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde in Abwesenheit von Triton X-100 und EDTA (Spuren 2, 4, 6, 8, 10 und 13), zwei weitere Aliquots entweder in Anwesenheit von Triton X-100 (Endkonzentration 0.5%)(Spuren 5, 9 und 14) oder in Anwesenheit von EDTA (Endkonzentration 5mM)(Spuren 6 und 10) mit Proteinase K behandelt und das vierte Aliquot wurde ohne Proteinase K behandelt (Spuren 1, 3, 7, 11 und 12). Nach Inkubation für 60min bei 0°C wurden alle Proben mit PMSE und mit demselben Volumen an zweifach konzentriertem Probenpuffer versetzt und durch Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert.

p, Vorläufer; m, reife Form; RM, Mikrosomen; ScaI, Restriktionsenzym ScaI; Puro, Puromycin; PK, Proteinase K; TX, Triton X-100.



die Assoziation mit Ribosomen hervorgerufen, da die Proteaseresistenz in Gegenwart von EDTA verlöschte (Abb. 37; Spur 6). Nach Zugabe von Puromycin zu der in Gegenwart von Mikrosomen synthetisierten Peptidyl-tRNA wurde keine proteaseresistente "Vorläufer"-Peptidyl-tRNA mehr beobachtet (Abb. 37; Spuren 8-10). Die Menge an reifer Form der nun wahrscheinlich in das entsprechende Peptidyl-Puromycin überführten Peptidyl-tRNA war jedoch gegenüber der Inkubation in Abwesenheit von Puromycin deutlich erhöht (Abb. 37; Spur 7). Offensichtlich war "Vorläufer"-Peptidyl-Puromycin von den Ribosomen freigesetzt und als "reife" Form in die Mikrosomen transportiert worden. Dies bewiesen die Proteaseresistenz der prozessierten Form von Peptidyl-Puromycin in Ab- oder Anwesenheit von EDTA (Abb. 37; Spuren 8 und 10) und die Proteasesensitivität in Gegenwart von Detergens (Abb. 37; Spur 9). Die Menge an proteaseresistenter "Vorläufer"-Peptidyl-tRNA in Abwesenheit von Puromycin (Abb. 37; Spur 4) entsprach ungefähr der Zunahme an proteaseresistenter reifer Form nach Zugabe von Puromycin (Abb. 37; Spur 8). Offenbar wurde durch Puromycin die zum großen Teil in den Ribosomen verbliebene "Vorläufer"-Peptidyl-tRNA in "Vorläufer"-Peptidyl-Puromycin umgewandelt, welches in Mikrosomen transportiert wurde. Die mit Ribosomen assoziierte "Vorläufer"-Peptidyl-tRNA wurde also als vollständig synthetisiertes Molekül angehäuft und posttranslational in Mikrosomen transportiert. Dagegen wurde das entsprechende Vorstufenprotein nur cotranslational (Abb. 37; Spuren 11-14) in Mikrosomen transportiert.

Möglicherweise verhindern somit die an das Vorstufenprotein gebundene tRNA oder das mit dem Vorstufenprotein assoziierte Ribosom oder tRNA und Ribosom zusammen die Ausbildung einer mit dem Transport in Mikrosomen unverträglichen Konformation des

Vorstufenproteins, in die es sich nach Vollendung der Synthese und nach Freisetzung von den Ribosomen falten würde. Die tRNS mag dabei nur eine indirekte Rolle spielen, indem sie die Freisetzung des Vorläufers von den Ribosomen verhindert. Der eigentliche Transport des Vorstufenproteins erfordert dann jedoch den Austausch der tRNS gegen Puromycin, sei es, daß die tRNS selbst die mikrosomale Membran nicht überqueren kann oder sei es, daß erst dadurch die Freisetzung des Vorläufers von den Ribosomen erfolgt. Die geringe Menge an Molekülen, die auch in Abwesenheit von Puromycin in die Mikrosomen gelangten (Abb. 37; Spuren 3 und 4), läßt sich auf vorzeitige Hydrolyse der tRNS von der Peptidyl-tRNS, womöglich durch im Retikulozytenlysat vorhandene Esterasen zurückführen.

Diese Beobachtungen erhärten die Annahme einer wichtigen Aufgabe des Ribosoms im Transport der von SRP und Dockingprotein abhängigen Vorstufenproteine in Mikrosomen. Diese ist nicht in der Notwendigkeit der Proteinsynthese während des Transports, sondern in der Aufrechterhaltung einer mit dem Transport vereinbaren Konformation des Vorstufenproteins zu sehen.

4. DISKUSSION

Der Transport von eukaryontischen Vorstufenproteinen über die Membran des endoplasmatischen Retikulums kann als eine Folge von drei Schritten aufgefaßt werden: i) Assoziation des Vorläufers mit der Membran ii) Insertion des Vorläufers in die Membran iii) Transfer der reifen Form über die Membran. Jeder dieser Schritte kann in der Regel wohl während der Elongation der naszierenden Polypeptidkette an Polysomen stattfinden. Die Synthese von sekretorischen Proteinen an membrangebundenen Polysomen in vivo liefert jedoch keinen Hinweis auf die Notwendigkeit einer strikten Koppelung zwischen den einzelnen Transportschritten und der Translation, die im Mechanismus des Transports begründet ist. Der Abschluß des Membrantransfers muß auf jeden Fall posttranslational erfolgen, da die letzten 50-60 Aminosäuren des Proteins zum Zeitpunkt der Beendigung der Translation noch im Ribosom und in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verborgen sind, d.h. noch nicht transferiert sind. Darüberhinaus mit der klassischen Signalhypothese nicht vereinbar ist der von der Proteinsynthese unabhängige in vitro Transport einiger Vorstufenproteine in Mikrosomen aus Hundepankreas und Hefe (Caulfield et al., 1986; Maher und Singer, 1986; Mueckler und Lodish, 1986a; Perara et al., 1986; Schlenstedt und Zimmermann, 1987). Ferner würde bei vektorieller Translation die Inkorporation von Proteinen, die die Membran mehrmals überspannen (bitopische und polytopische Membranproteine: Blobel, 1980; Sabatini et al., 1982) die abwechselnde Synthese an membrangebundenen und freien Polysomen erfordern (Friedlander und Blobel, 1985; Rapoport und Wiedmann, 1985). Dieser rasche Wechsel des Syntheseorts erscheint aus kinetischen Gründen unwahrscheinlich. Dennoch kann der Gesamt-

vorgang des Transports der meisten bisher untersuchten Vorstufenproteine in das endoplasmatische Retikulum nicht nach Abschluß ihrer Synthese stattfinden. Offenbar ist der eine oder andere Transportschritt mit dem vollständig synthetisierten Vorstufenprotein nicht vereinbar.

4.1. Zum Mechanismus der Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums

Vorstufenproteine mit einem Molekulargewicht $< 9\text{kD}$, die vom eukaryontischen sekretorischen Protein Prepromelittin der Honigbiene abgeleitet sind, werden als vollständig synthetisierte Proteine in mikrosomale Vesikel transportiert. Für die Assoziation dieser Vorstufenproteine, wie auch des authentischen Prepromelittins (Zimmermann und Mollay, 1986), mit der mikrosomalen Membran ist also die Wechselwirkung zwischen Signalsequenz, SRP und Dockingprotein nicht erforderlich. Offenbar wird die Signalsequenz von Prepromelittin entweder allein oder in Kooperation mit Strukturen innerhalb des reifen Teils von Prepromelittin bzw. der von Prepromelittin abgeleiteten Vorstufenproteine von einem Rezeptorsystem der mikrosomalen Membran erkannt. Diese Assoziation zwischen Vorläufer und Membran kann eine Protein/Protein- oder eine Protein/Lipid-Wechselwirkung oder beides umfassen.

Anstelle der Wechselwirkung zwischen Signalsequenz, SRP und Dockingprotein scheint bei kleinen Vorstufenproteinen die Konformation des gesamten Proteins für die Membranassoziation von Bedeutung zu sein. Dafür sprechen im Falle von Prepromelittin und verwandten Vorstufenproteinen die strukturellen Voraussetzungen für den von SRP und Dockingprotein unabhängigen Transport in Mikrosomen. Diese wurden nach Konstruktion von fünf Klassen von Hybridproteinen zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatre-

duktase ermittelt. Alle Hybridproteine wurden auf ihre Assoziation mit Mikrosomen, sowie auf ihre Befähigung zum Transport in Mikrosomen in der Gesamtreaktion geprüft. Sie besitzen den aminoterminalen Bereich und die hydrophobe Region der Signalsequenz von Prepromelittin. Vier Klassen enthalten auch die authentische Spaltstelle der Signalpeptidase, während eine Klasse eine leicht veränderte Spaltstelle besitzt. Beide Signalsequenzen sind in der Lage, den Transport des cytoplasmatischen Enzyms Dihydrofolatreduktase der Maus in mikrosomale Vesikel mit Hilfe von SRP und Dockingprotein zu vermitteln. Offensichtlich kann das Signalpeptid von Prepromelittin mit SRP und Dockingprotein in Wechselwirkung treten, wenn der reife Teil des Vorstufenproteins groß genug ist. Beide Signalsequenzen erlauben auch den Transport von kleineren Vorläufern, deren reifer Teil mit Promelittin nicht verwandt ist, jedoch unabhängig von SRP und Dockingprotein. Der Übergang von SRP/Dockingprotein-abhängigem zu unabhängigem Transport vollzieht sich zwischen einem Molekulargewicht der Vorstufenproteine von 9kD bis 8,5kD. Ein ähnlicher Einfluß der Größe war bereits für den SRP/Dockingprotein-unabhängigen Transport des kleinen sekretorischen Proteins Prepropeptid GLa des Frosches beobachtet worden (Schlenstedt und Zimmermann, 1987). Dem scheint zu widersprechen, daß eine verkürzte Form des sekretorischen Proteins Prelisozym mit 74 Aminosäuren für den Transport in Mikrosomen SRP benötigt (Ibrahimi et al., 1986). Jedoch lag dieser Vorläufer nicht als vollständig synthetisierte Polypeptidkette, sondern als Peptidyl-tRNS vor. Die gebundene tRNS mag die Abhängigkeit von SRP und Dockingprotein verursachen und damit den Transport eines sonst inkompetenten Vorstufenproteins erlauben.

Es ist gegenwärtig unklar, ob die kleinen Vorstufenproteine zwar auf die Gegenwart eines funktionellen SRP/Dockingprotein-

Systems verzichten können, dieses aber, falls vorhanden, dennoch für den Transport in Mikrosomen benutzen. Es stellt sich daher die Frage, ob die Signalsequenz von Prepromelittin innerhalb aller Hybridproteine zwischen Prepromelittin und Dihydrofolatreduktase oder nur innerhalb der größeren, aber nicht innerhalb der kleineren Vorstufenproteine mit SRP in Wechselwirkung tritt. Wahrscheinlich trifft aus den folgenden Gründen letzteres zu: Die Gegenwart von aktivem Dockingprotein führt zu keiner Erhöhung der Effizienz des Transports der kleinen Vorstufenproteine. Ferner dürfte an Vorstufenproteine gebundenes SRP die Membranüberquerung dieser Proteine verhindern, falls es nicht zu einer Wechselwirkung mit Dockingprotein kommt. Auch scheint, neueren Ergebnissen zufolge, die posttranslationale Bindung von SRP an Vorstufenproteine nicht möglich zu sein: Die Bindung kann zwar spät während der Synthese der Vorstufenproteine erfolgen, aber eben nur solange diese nicht abgeschlossen ist (Ainger und Meyer, 1986). Vollständig synthetisierte und von den Ribosomen freigesetzte Vorstufenproteine sind also nicht mehr in der Lage, an SRP zu binden. Es steht zu vermuten, daß das Ribosom an diesem Schritt beteiligt ist (Wiedmann et al., 1987a). Die im SRP vorhandene 7S RNS legt eine Wechselwirkung zwischen SRP und ribosomaler RNS oder mRNA nahe. Im Fall der kleinen Vorstufenproteine, wie Prepromelittin, sollte die Polypeptidkette vollendet und vom Ribosom freigesetzt worden sein, bevor das Signalpeptid zur Wechselwirkung mit SRP weit genug aus der großen ribosomalen Untereinheit hervortreten kann. Es wird angenommen, daß 40-50 Aminosäuren einer Polypeptidkette innerhalb der großen Untereinheit des eukaryontischen Ribosoms verborgen sind (Blobel und Sabatini, 1970). Die vom Ribosom nicht mehr umgebenen aminoterminalen 20-30 Aminosäuren von kleinen Vorstufenproteinen reichen

möglicherweise zur Bindung an SRP noch nicht aus. Tatsächlich scheint eine Kettenlänge von mindestens 70 Aminosäuren erforderlich zu sein, bevor eine Wechselwirkung zwischen SRP und der naszierenden Polypeptidkette erfolgen kann (Walter und Blobel, 1981).

Möglicherweise ist die beobachtete Dockingprotein-Abhängigkeit des Transports von Hybridproteinen mit einem Molekulargewicht über 9kD, deren verkürzte Versionen ohne Hilfe von SRP und Dockingprotein in Mikrosomen transportiert werden, auf die obligatorische Bindung von im Retikulozytenlysat vorhandenem SRP zurückzuführen. Wahrscheinlich stellt jedoch die Wechselwirkung zwischen SRP und Dockingprotein eine unabdingbare Voraussetzung für den Transport von Vorstufenproteinen dar, die ein bestimmtes Molekulargewicht überschreiten. Untersuchungen im Weizenkeimlysat, supplementiert mit Mikrosomen aus Hundepankreas, die durch Behandlung mit hoher Salzkonzentration von Dockingprotein gebundenem SRP befreit wurden, sollten klären, ob die im Retikulozytenlysat Dockingprotein-abhängigen Vorstufenproteine in Abwesenheit von SRP unabhängig von Dockingprotein in Mikrosomen transportiert werden.

Neben der Größe von Vorstufenproteinen ist auch die Verteilung von geladenen Aminosäuren innerhalb des reifen Teils für den SRP/Dockingprotein-unabhängigen Transport in das endoplasmatische Retikulum von Bedeutung. Die amino- und carboxyterminalen Bereiche des reifen Teils müssen entweder ungeladen sein oder, falls Ladungen vorhanden sind, müssen geladene Aminosäuren an einem Ende durch Aminosäuren mit entgegengesetzter Ladung am anderen Ende der Polypeptidkette ausgeglichen werden. Im Falle von Prepromelittin steht einer Folge von negativ geladenen Aminosäuren im aminoterminalen Bereich des reifen Teils eine

Folge von positiv geladenen Aminosäuren im carboxyterminalen Bereich gegenüber. Bei allen kleinen Vorstufenproteinen wurde eine Korrelation zwischen der Fähigkeit zum Transport in Mikrosomen und der Unabhängigkeit vom funktionellen SRP/Dockingprotein-System beobachtet.

Die Bedeutung der Struktur des reifen Teils für die Membranassoziation zeigte die Inkubation von Mikrosomen mit Vorstufenproteinen unter Bedingungen, die die Trennung der Membranassoziation von den nachfolgenden Schritten der Membraninsertion und des Membrantransfers ermöglichten. Inkubation bei niedriger Temperatur war schon erfolgreich zur Analyse der Bindung von Vorstufenproteinen an Mitochondrien (Pfaller et al., 1985; Pfaller und Neupert, 1987; Pfanner und Neupert, 1987), Peroxisomen (Small et al., 1987) und Chloroplasten (Cline et al., 1987) benutzt worden. Nur zum Transport befähigte kleine Vorstufenproteine sind in der Lage, mit der mikrosomalen Membran zu assoziieren. Nach Erhöhung der Temperatur auf 37°C inserieren sie anschließend direkt, d.h. ohne intermediäre Aufhebung der Bindung, von der Assoziationsstelle aus in die mikrosomale Membran. Demgegenüber weisen inaktive Vorstufenproteine mit unbalancierten geladenen Aminosäuren in den terminalen Bereichen ihres reifen Teils keine Fähigkeit zur Membranassoziation auf. Die Membranassoziation kleiner Vorstufenproteine hängt nicht von der Gegenwart von Nukleosidtriphosphaten ab.

Die Befähigung von kleinen Vorstufenproteinen zur Assoziation mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums scheint auf folgenden strukturellen Voraussetzungen zu beruhen: i) einer Membran überspannenden Region, gebildet von der Folge hydrophober Aminosäuren innerhalb des Signalpeptids (Abb. 12A) und ii) einer "Haarnadel-Struktur", gebildet vom reifen Teil des Vorstufenpro-

teins. Diese führt zur unmittelbaren Nachbarschaft der amino- und carboxyterminalen Bereiche des reifen Teils. Damit würde gegebenenfalls eine Ladungskompensation zwischen entgegengesetzt geladenen Aminosäuren in diesen Regionen bewirkt (Abb. 12B).

Eine solche Struktur kann tatsächlich von den von Prepromelittin abgeleiteten Vorstufenproteinen im Retikulozytenlysat ausgebildet werden. Dies zeigte die Möglichkeit, eine Disulfidbrücke in ihren reifen Teil einzuführen. Da sich die beiden Cysteinreste bei angenommener Paarung der entgegengesetzt geladenen Aminosäuren an gegenüberliegenden Positionen im reifen Teil befinden, setzt die Bildung einer Disulfidbrücke eine der postulierten "Haarnadel-Struktur" entsprechende Konformation des reifen Teils voraus. Es bleibt jedoch offen, ob die kleinen von Prepromelittin abgeleiteten Vorstufenproteine im Retikulozytenlysat per se eine definierte Tertiärstruktur in Form einer Haarnadel besitzen. Alternativ könnte die Flexibilität des reifen Teils die Ausbildung jedmöglicher Konformation (Purvis et al., 1987; Kauzman, 1987) und damit auch einer "Schlaufenstruktur" ermöglichen. Diese würde dann unter oxidierenden Bedingungen durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den sich "zufällig" gegenüberstehenden Cysteinresten fixiert werden (Kaderbhai and Austen, 1985; Snyder, 1987). Dabei könnte eine Wechselwirkung der entgegengesetzt geladenen Aminosäuren die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der beiden Cysteinreste in enger Nachbarschaft zueinander erhöhen.

Die Fähigkeit der Vorstufenproteine mit ausgebildeter Disulfidbrücke zur Assoziation mit Mikrosomen beweist die Vereinbarkeit der haarnadelförmigen Konformation ihres reifen Teils mit dem ersten Schritt des Transports in Mikrosomen. Da Vorstufenproteine mit Disulfidbrücke im reifen Teil nicht in die mikrosomale Membran inserieren, Disulfidbrücken als kovalente Bindung per se

jedoch mit Membraninsertion vereinbar sind, liegt die Annahme nahe, daß die haarnadelförmige Konformation des reifen Teils für die Membranassoziation und nur für diese erforderlich ist. Ein direkter Nachweis der Notwendigkeit einer "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils für die Assoziation des Vorläufers mit der mikrosomalen Membran konnte bisher allerdings nicht erbracht werden. Jedoch ist eine "Haarnadelstruktur" per se für die Membranassoziation sicherlich nicht ausreichend. Transportinkompetente Vorstufenproteine mit unbalanzierten Ladungen in den terminalen Bereichen ihres reifen Teils assoziieren auch nach Einführung einer Disulfidbrücke in ihren reifen Teil nicht mit Mikrosomen. Die Ladungskompensation in den terminalen Bereichen des reifen Teils mag die *primäre* Voraussetzung für Membranassoziation darstellen. Dies würde dann *sekundär* zur Ausbildung einer "Haarnadelstruktur" führen. Die Bedeutung des carboxyterminalen Bereichs für den Transport der kleinen Vorstufenproteine im allgemeinen und die Membranassoziation im besonderen ist ein weiterer Hinweis, daß der Transport dieser Proteine nur posttranslational erfolgen kann.

Ein Einfluß des reifen Teils eines Vorstufenproteins auf den Transport in das endoplasmatische Retikulum wurde kürzlich für den Präpro- α -Faktor (108 Aminosäuren) der Hefe nachgewiesen (Rothblatt et al., 1987). Posttranslationaler Transport in Hefemikrosomen war nur für Varianten dieses Proteins möglich, die wenigstens eine der vier authentischen, repetitiven Sequenzen der carboxyterminalen Region besaßen. Im Gegensatz zu Prepromelittin spielte dabei jedoch die Proregion keine Rolle. Ein Hybridprotein zwischen Präpro- α -Faktor und dem "Passagierprotein" Globin wurde dagegen nur cotranslational transportiert. Es ist gegenwärtig noch unklar, ob Hefezellen SRP und Dockingprotein ähnliche

Strukturen besitzen. Falls ja, könnte das kritische Molekulargewicht von Vorstufenproteinen für die Wechselwirkung mit diesen Komponenten in Hefezellen etwas größer sein als bei höheren Eukaryonten.

Die Bedeutung des reifen Teils für den Einbau eines Vorstufenproteins in eine Membran wurde für das Procoat Protein des Bakteriophagen M13 aufgezeigt. Interessanterweise weist Prepromelittin eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit mit M13 Procoat Protein hinsichtlich Größe des Vorläufers und Verteilung von geladenen Aminosäuren innerhalb des reifen Teils auf (Asbeck et al., 1969; Nakashima und Konigsberg, 1974). Der Vorläufer von M13 Coat Protein benötigt für den Einbau in die bakterielle Plasmamembran in vivo und in vitro (Wolfe et al., 1985) oder in mikrosomale Membranen (Watts et al., 1983) weder die Proteinsynthese noch eine der bekannten, für den Transport einer Vielzahl von Vorstufenproteinen erforderlichen proteinhaltigen Faktoren (Beckwith und Ferro-Novick, 1986; Watts et al., 1983). Der Einbau von M13 Procoat Protein in die Plasmamembran von E.coli hängt nicht nur von der Gegenwart des positiv geladenen carboxyterminalen Bereichs ab (Kuhn et al., 1986b), sondern im Gegensatz zu Prepromelittin, auch von der Gegenwart der hydrophoben Domäne innerhalb des reifen Proteins (Kuhn et al., 1986a). Dieser Unterschied könnte auf die Notwendigkeit einer apolaren Region als spontane "Insertionsdomäne" oder zur Verankerung des Membranproteins M13 Coat Protein in der Membran zurückzuführen sein. Über einen Einfluß der negativ geladenen Aminosäuren im aminoterminalen Bereich der Coat-Domäne auf das Transportverhalten von M13 Procoat Protein ist bisher nichts bekannt. Somit bleibt offen, ob zur Membranassoziation von M13 Procoat Protein der stark basische Carboxyterminus eine elektrostatische Wech-

selwirkung mit den sauren Fettsäurekopfgruppen der Membranlipide oder mit den sauren Aminosäureseitenketten im aminoterminalen Bereich seines reifen Teils eingehen muß.

Für mitochondriale Vorstufenproteine wird in jüngster Zeit die Beteiligung von Regionen innerhalb ihres reifen Teils an der Assoziation mit Mitochondrien diskutiert. Spezifische Bindung an proteasesensitive Rezeptoren der äußeren mitochondrialen Membran wurde für den Vorläufer der Untereinheit 9 der ATPase von *Neurospora crassa* und für Hybridproteine zwischen diesem und der Dihydrofolatreduktase der Maus beobachtet, nicht jedoch für Fusionen zwischen der Präsequenz dieses Vorläufers und der Dihydrofolatreduktase (Pfanner et al., 1987a). Somit scheint die hydrophobe Region der reifen Untereinheit 9 für die Assoziation mit Mitochondrien verantwortlich zu sein, während hierzu beim Apocytochrom c von *Neurospora crassa* der Carboxyterminus eine wichtige Rolle spielt (Stuart et al., 1987).

Über die Natur der Assoziation der von Prepromelittin abgeleiteten Vorstufenproteine mit der mikrosomalen Membran sind bisher keine Aussagen möglich. Es stellt sich die Frage, ob kleine Vorstufenproteine ausschließlich mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums assoziieren oder auch mit anderen intrazellulären Membranen Kontakt aufnehmen. Im letzteren Fall würden erst die der Membranassoziation folgenden Schritte die Spezifität des gesamten Transportvorgangs in das endoplasmatische Retikulum gewährleisten.

4.2. Zum Mechanismus der Insertion von kleinen Vorstufenproteinen in die Membran des endoplasmatischen Retikulums

Die Disulfidbrücke innerhalb des reifen Teils der Vorstufenproteine muß geöffnet werden, um Membraninsertion zu ermögli-

chen. Der hemmende Einfluß von Disulfidbrücken auf die Insertion läßt sich auf die Stabilisierung der "Haarnadel-Struktur" innerhalb des reifen Teils dieser Vorstufenproteine zurückführen. Disulfidbindungen per se scheinen mit dem Transport in das endoplasmatische Retikulum vereinbar zu sein. Die mit der Membranassoziation zu vereinbarende "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils von zum Transport befähigten kleinen Vorstufenproteinen darf offensichtlich nicht während der Membranınsertion beibehalten werden.

Neben der Abwesenheit von Disulfidbrücken erfordert die Membranınsertion die Gegenwart von Nukleosidtriphosphaten. Damit stellt sie den Schritt oder wenigstens einen der Schritte dar, die für die Energieabhängigkeit des Transports kleiner Vorstufenproteine in Mikrosomen verantwortlich sind. In jüngster Zeit veröffentlichte Untersuchungen beweisen die Notwendigkeit von Nukleosidtriphosphaten für den Transport von Proteinen in Mitochondrien (Pfanner und Neupert, 1986; Chen und Douglas, 1987; Eilers et al., 1987; Pfanner et al., 1987b), Chloroplasten (Grossman et al., 1980; Flügge und Hinz, 1986; Pain und Blobel, 1987), Peroxisomen (Bellion und Goodman, 1987), invertierte Vesikel der inneren Membran von E.coli (Chen und Tai, 1985; Geller et al., 1986; Yamane et al., 1987), Mikrosomen, die vom endoplasmatischen Retikulum der Hefe abgeleitet sind (Hansen et al., 1986; Rothblatt und Meyer, 1986a und b; Waters und Blobel, 1986) und Mikrosomen aus Hundepankreas (Caulfield et al., 1986; Conolly und Gilmore, 1986; Mueckler und Lodish, 1986a und b; Perara et al., 1986; Schlenstedt und Zimmermann, 1987; Wiech et al., 1987). In allen diesen Fällen steht eine eindeutige Zuordnung des Bedarfs an Nukleosidtriphosphaten zu einem bestimmten Transportschritt noch aus. Bisher wurde für den Import des

ADP/ATP-Carriers in Mitochondrien von Neurospora crassa eine Beteiligung von Nukleosidtriphosphaten an der Assoziation mit und Insertion in die äußere mitochondriale Membran, nicht jedoch an der Bildung eines "Translokations-Intermediates" zwischen äußerer und innerer Membran und an der nachfolgenden Insertion in die innere Membran vorgeschlagen. Dagegen waren im Fall der β -Untereinheit der F_1 -ATPase Nukleosidtriphosphate auch für die Transportschritte nach erfolgter Bildung des "Translokations-Intermediates" erforderlich (Pfanner et al., 1987b).

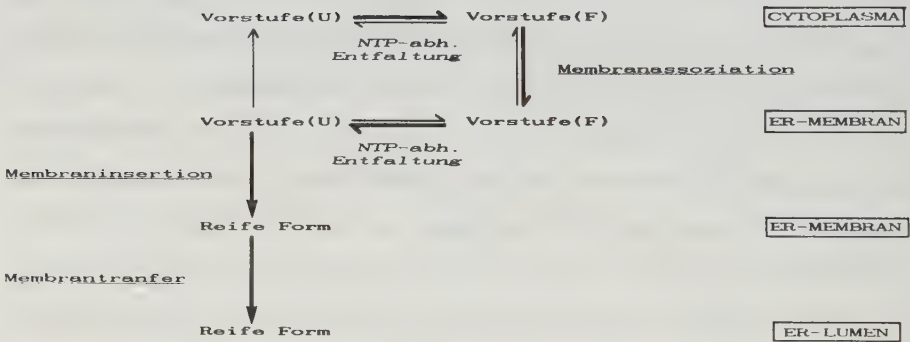
Hybridproteine zwischen der Vorstufe der Untereinheit 9 der ATPase aus Neurospora crassa und der Dihydrofolatreduktase der Maus, die sich lediglich in ihrem reifen Teil unterschieden, erforderten für ihren Import in Mitochondrien unterschiedliche Mengen an Nukleosidtriphosphaten (Pfanner et al., 1987b). Für den Transport von Prepropeptid GLa und M13 Procoat Protein in Mikrosomen aus Hundepankreas konnte ebenfalls eine Abhängigkeit von Nukleosidtriphosphaten in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet werden (Schlenstedt und Zimmermann, 1987; Wiech et al., 1987). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß verschiedene von Prepromelittin abgeleitete Vorstufenproteine, welche alle das Signalpeptid von Prepromelittin besitzen, einen unterschiedlichen Bedarf an Nukleosidtriphosphaten für ihren Transport in Mikrosomen aufweisen. Vorstufenproteine, die eine einzelne geladene Aminosäure oder eine Anhäufung von geladenen Aminosäuren im aminoterminalen Bereich ihres reifen Teils und gleichzeitig eine entgegengesetzt geladene Aminosäure bzw. eine Anhäufung von entgegengesetzt geladenen Aminosäuren im carboxyterminalen Bereich ihres reifen Teils enthalten, werden nur in Gegenwart von Nukleosidtriphosphaten in die mikrosomale Membran inseriert. Dagegen benötigen Vorstufenproteine, die an beiden terminalen

Bereichen ihres reifen Teils keine geladenen Aminosäuren aufweisen, zur Membraninsertion keine oder nur sehr geringe Mengen an Nukleosidtriphosphaten. Offensichtlich bestimmen die Struktur des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine und dabei im Besonderen, die Lage und Verteilung von geladenen Aminosäuren den Bedarf an Nukleosidtriphosphaten. Dagegen scheint die Zahl der Ladungen, die in die mikrosomale Membran zu inserieren haben, eine geringere Bedeutung zu besitzen, solange sie kompensiert werden. Der Bedarf an Nukleosidtriphosphaten verschiedener Vorstufenproteine korreliert mit ihrer Abhängigkeit von einer löslichen Komponente aus dem Kaninchen-Retikulozytenlysat. Dies legt nahe, daß sich im Retikulozytenlysat eine NTP-abhängige Komponente befindet, die die Insertion von assoziierten kleinen Vorstufenproteinen in die Membran von Mikrosomen ermöglicht. Das Substrat dieser Aktivität kann letzten Endes nur das zu transportierende Protein selbst sein. Die durch sie bewirkte Modifikation des Vorstufenproteins kann grundsätzlich die Veränderung des Aggregationszustands, die nicht-kovalente Assoziation mit anderen Molekülen, die kovalente Modifikation (z.B. Phosphorylierung) oder die Änderung der Tertiärstruktur umfassen. Jede dieser möglichen Modifikationen könnte eine Erhöhung der Proteasesensitivität der kleinen Vorstufenproteine in Anwesenheit von Nukleosidtriphosphaten bedingen.

Im Retikulozytenlysat sollte ein Gleichgewicht zwischen der relativ proteaseresistenten und zur Membranassoziation fähigen Form des Vorstufenproteins mit hohem Grad an Tertiärstruktur ("Haarnadel-Struktur") im reifen Teil und der relativ proteasesensitiven und zur Membraninsertion fähigen Form mit einem geringeren Grad an Tertiärstruktur vorliegen. Dabei vermag die NTP-abhängige Komponente die Geschwindigkeit der Gleichgewichts-

Abb. 38A: Hypothetische Gleichgewichtsverteilung zwischen der gefalteten und ungefalteten Form von kleinen Vorstufenproteinen

Vorstufe(U), Vorstufenprotein in Konformation mit geringem Grad an Tertiärstruktur (ohne "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils);
 Vorstufe(F), Vorstufenprotein in Konformation mit hohem Grad an Tertiärstruktur (mit "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils).



einstellung zu erhöhen, unabhängig davon, ob der Vorläufer frei im Cytoplasma oder bereits mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums assoziiert vorliegt (Abb. 38A). Das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Formen des Vorläufers und damit die gesamte Transportreaktion selbst würde demzufolge von der im Cytoplasma gelösten, ungefalteten Form des Vorstufenproteins nach der Proteinsynthese über die zunächst im Cytoplasma gelöste und nachfolgend Membran assoziierte gefaltete Form in Richtung der Membran assoziierten ungefalteten Form verschoben. Diese könnte durch die irreversible Reaktion der Membraninsertion und/oder des Membrantransfers aus dem Gleichgewicht der Membranassoziationsreaktion entfernt werden. Die Membraninsertion der ungefalteten und mit der Membran assoziierten Form des Vorstufenproteins erfolgt dabei schneller als ihre Ablösung von der Membran und Freisetzung in das Cytoplasma (Abb. 38A). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Vorstufenproteinen hinsichtlich ihres Bedarfs an Nukleosidtriphosphaten dürften dabei Unterschiede in der Gleichgewichtsverteilung des jeweiligen Proteins zwischen der Konformation mit hohem und mit niedrigem Grad an Tertiärstruktur widerspiegeln. Keine Klarheit herrscht gegenwärtig darüber, welches Nukleosidtriphosphat für diesen Entfaltungsvorgang die direkte Energiequelle darstellt, und über den Grad der Entfaltung. Offenbar ist ein ziemlich hoher Grad an Entfaltung notwendig, da die Stabilisierung der Tertiärstruktur einer relativ kleinen Domäne von 16 Aminosäuren innerhalb des reifen Teils der kleinen Vorstufenproteine durch eine Disulfidbrücke mit der Membraninsertion nicht mehr vereinbar ist.

Die an der Membraninsertion beteiligte Komponente des Retikulozytenlysats könnte Gemeinsamkeiten mit den aus verschiedenen Organismen isolierten Hitzeschockproteinen besitzen, denen eine

Rolle bei der ATP-abhängigen Renaturierung von teilweise denaturierten und von naszierenden Polypeptiden zugeschrieben wird (Lewis und Pelham, 1985; Pelham, 1986). In Hefezellen, in denen gleichzeitig drei für solche Proteine kodierende Gene inaktiviert worden waren (Werner-Washburne et al., 1987), wurde kein Transport des Präpro- α -Faktors und der Invertase in das endoplasmatische Retikulum mehr beobachtet (R. Scheckman, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Beteiligung einer NTP-abhängigen Komponente des Retikulozytenlysats wurde bereits für den Einbau von M13 Procoat Protein in mikrosomale Membranen beschrieben (Wiech et al., 1987). Eine proteinhaltige Komponente des Hefe-Cytoplasmas ist für den effizienten Transport des Präpro- α -Faktors in Hefe-Mikrosomen erforderlich (Waters et al., 1986). Darüberhinaus sind einige lösliche proteinhaltige Faktoren charakterisiert, welche den Transport von periplasmatischen Proteinen und Proteinen der Außenmembran in *E.coli* in vivo (Oliver und Beckwith, 1982; Randall und Hardy, 1986) oder in vitro stimulieren (Müller und Blobel, 1984; Crooke and Wickner, 1987). Cytosolische, RNS enthaltende Faktoren sollen beim Import von Vorstufenproteinen in die Matrix von Mitochondrien eine Rolle spielen (Argan et al., 1983; Argan und Shore, 1985; Firgaira et al., 1984; Miura et al., 1983; Ohta und Schatz, 1984). Es ist jedoch gegenwärtig noch unklar, ob die Aktivität dieser Faktoren von Nukleosidtriphosphaten abhängt und im Zusammenhang mit der Erhaltung oder Ausbildung einer mit dem Transport zu vereinbarenden Konformation des Vorstufenproteins steht.

Einige Beobachtungen sprechen für eine analoge Rolle von Nukleosidtriphosphaten beim Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum und in Mitochondrien: Der Aktionsort von Nukleosidtriphosphaten während des Imports von Proteinen in Mito-

chondrien wurde außerhalb der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert (Chen und Douglas, 1987). Naszierende und damit unvollständig gefaltete Polypeptidketten mitochondrialer Vorstufenproteine wurden andererseits auch in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten in Mitochondrien importiert (Verner und Schatz, 1987). Schließlich konnte der Import eines Hybridproteins zwischen der Präsequenz der Untereinheit IV der Cytochrom-Oxidase der Hefe und der Dihydrofolatreduktase der Maus in Mitochondrien von Saccharomyces cerevisiae durch Bindung eines Liganden der Dihydrofolatreduktase verhindert werden. Dies zeigte die Bedeutung einer flexiblen Konformation oder einer Konformation mit geringem Grad an Tertiärstruktur für den Transport über mitochondriale Membranen. (Eilers und Schatz, 1986). Jedoch war in diesem Fall in Gegenwart des Liganden bereits keine Bindung des Hybridproteins an die Mitochondrien mehr zu beobachten.

4.3. Zum Mechanismus des Transfers der reifen Form kleiner Vorstufenproteine über die Membran des endoplasmatischen Retikulums

Die Inaktivierung einer proteasesensitiven Komponente der mikrosomalen Membran führt zur Anhäufung von Intermediaten im Transport von Prepromelittin (Zimmermann und Mollay, 1986) und von einem kleinen Vorstufenprotein, welches die hydrophobe Domäne von Melittin besitzt. Diese Intermediate werden mit ihrem Amino-terminus in die mikrosomale Membran inseriert, können aber nicht über die Membran in das Lumen der mikrosomalen Vesikel transportiert werden. Die proteasesensitive Komponente spielt jedoch keine Rolle beim Membrantransfer anderer kleiner Vorstufenproteine, wie Prepropeptid GLa (Schlenstedt und Zimmermann, 1987) und von großen Vorstufenproteinen. Sie sollte jedoch zumindest am

Transport einer bestimmten Klasse von Vorstufenproteinen in das endoplasmatische Retikulum beteiligt sein. Das endoplasmatische Retikulum des Hundepankreas dürfte kaum eine Aktivität enthalten, die ausschließlich zum Membrantransfer von Proteinen aus dem Bienengift notwendig ist.

Die apolare Domäne des reifen Melittins erfüllt einige der bisher formulierten Kriterien einer "Stop Transfer Sequenz" (Davis und Model, 1985; Davis und Hsu, 1986; Paterson und Lamb, 1987). Die Freisetzung einer innerhalb einer Polypeptidkette gelegenen Sequenz hydrophober Aminosäuren, die andernfalls als "Stop Transfer Sequenz" oder Membrananker wirken würde (Yost et al., 1983), aus der mikrosomalen Membran könnte eine Funktion dieser mikrosomalen Komponente sein (Abb. 12D und E). Ein pH-Gradient über der Membran mag dabei eine Rolle spielen. Tatsächlich wurde eine Protonen translozierende Aktivität sowohl in glatten als auch in rauhen mikrosomalen Membranen der Rattenleber identifiziert (Rees-Jones und Al-Awqati, 1984). Die Sensitivität Melittins gegenüber einem Potential haben Modelluntersuchungen an künstlichen Lipidmembranen ergeben. Die Assemblierung des reifen Melittins zu funktionellen Poren erfolgt spannungsabhängig (Kempf et al., 1982; Tosteson und Tosteson, 1981). Jedoch zeigten verschiedene Ionophore keinen Einfluß auf den Transport von Prepromelittin in Mikrosomen im allgemeinen oder auf den Transfer von Promelittin über die mikrosomale Membran im besonderen (Daten nicht gezeigt).

Die unbekannte proteasesensitive Komponente der mikrosomalen Membran konnte bisher nicht reversibel gehemmt werden (R. Zimmermann, unveröffentlichte Ergebnisse). Damit entfällt die Möglichkeit den Membrantransfer des Intermediates von Promelittin in das Lumen der Mikrosomen zu untersuchen. Die Membraninsertion und

der Membrantransfer der anderen kleinen Vorstufenproteine ohne hydrophobe Domäne konnten bisher durch Anhäufung von Intermediaten nicht voneinander entkoppelt werden. Deshalb bleibt gegenwärtig offen, ob die NTP-abhängige Komponente des Retikulytenlysats auch am Membrantransfer der reifen Formen beteiligt ist.

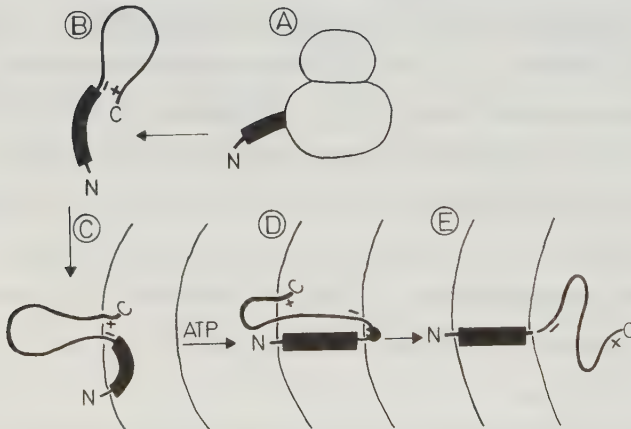
Die beschriebenen Intermediate im Transport kleiner Vorstufenproteine in das endoplasmatische Retikulum sind hinsichtlich ihrer Topologie mit Intermediaten mitochondrialer Vorstufenproteine vergleichbar. Diese wurden während ihres Imports in Mitochondrien durch Inkubation bei niedriger Temperatur oder durch Bindung von Antikörpern an die Vorläufer angehäuft. (Schleyer und Neupert, 1985). Die bei niedriger Temperatur beide mitochondriale Membranen überspannende, Proteasen an der Außenseite der Mitochondrien zugängliche reife Form der β -Untereinheit der F_1 -ATPase wurde nach Erhöhung der Temperatur in eine proteaseresistente Lokalisation an der Innenseite der inneren mitochondrialen Membran überführt. Dies erforderte die Gegenwart von Nukleosidtriphosphaten (Pfanner et al., 1987b).

4.4. Hypothetischer Mechanismus zum Transport kleiner Vorstufenproteine in das endoplasmatische Retikulum

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit und anderen Untersuchungen ist folgender hypothetischer Transportmechanismus für kleine Proteine denkbar: Vorstufenproteine, die aus weniger als 80 Aminosäuren bestehen, werden vom Ribosom freigesetzt, bevor eine Wechselwirkung zwischen Signalpeptid und SRP bzw. Ribosom und Ribosomenrezeptor erfolgen kann (Abb. 38B, A und B). Tatsächlich benötigt Prepropeptid GLa (64 Aminosäuren), M13 Procoat Protein (78 Aminosäuren) und Prepro- α -Faktor der Hefe (108

Abb. 38B: Hypothetischer Mechanismus des Transports von kleinen Vorstufenproteinen in das endoplasmatische Retikulum

- (A) Synthese des Vorstufenproteins an freien cytoplasmatischen Ribosomen
- (B) Lösliches Vorstufenprotein im Cytoplasma
- (C) Assoziation des Vorstufenproteins mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums
- (D) Insertion des Vorstufenproteins in die Membran des endoplasmatischen Retikulums und Abtrennung des Signalpeptids durch die Signalpeptidase
- (E) Transfer des reifen Proteins über die Membran in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums



Aminosäuren) für den Transport in Mikrosomen keine Wechselwirkung zwischen Ribosom und Ribosomenrezeptor (Schlenstedt und Zimmermann, 1987; Wiech et al., 1987; Hansen et al., 1986). Die Synthese kleiner Vorstufenproteine beginnt und endet somit an freien cytoplasmatischen Ribosomen (Abb. 38B, A). Die Primärstruktur der kleinen Vorstufenproteine haben sich jedoch in einer Art evolviert, die es ihnen erlaubt, auch ohne die Hilfe des SRP/Dockingprotein- und Ribosom/Ribosomenrezeptor-Systems eine zur Assoziation mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums fähige Struktur anzunehmen. Zwei grundsätzliche Kriterien sind vorstellbar, die eine zur Assoziation befähigte Struktur eines von Prepromelittin abgeleiteten Vorstufenproteins zu erfüllen hat (Abb. 38B, B):

i) Das Signalpeptid muß an der Oberfläche des Vorläufers exponiert sein und darf nicht durch den reifen Teil des Proteins maskiert werden. Eine "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils, welche amino- und carboxyterminale Bereiche in unmittelbare Nähe zueinander bringt, sollte die freie Zugänglichkeit des Signalpeptids gewährleisten. Dies ermöglicht die erste Kontaktaufnahme des Signalpeptids mit der Membran. Ionische Wechselwirkungen zwischen den terminalen Bereichen des reifen Teils mögen diese Struktur stabilisieren. Die Gegenwart von nicht kompensierten Ladungen in diesen Regionen mag hingegen destabilisierend wirken.

ii) Die amino- und carboxyterminalen Bereiche des reifen Proteins müssen frei von unkompensierten Ladungen sein, da sie während der Membranassoziation gleichzeitig mit der Membran in Wechselwirkung treten und dabei in die apolare Lipiddoppelschicht eintauchen müssen. Dies führt zwangsläufig zur Ausbildung einer "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils.

Beiden Vorstellungen zufolge nimmt der reife Teil von kleinen Vorstufenproteinen während der Assoziation mit der Membran die Form einer Haarnadel ein (Abb. 38B, C). Sogar Disulfidbrücken innerhalb des reifen Teils sind mit diesem Schritt vereinbar, obwohl sie wahrscheinlich niemals in vivo auftreten (Obha et al., 1981; Peters und Davidson, 1982; Pigiet und Schuster, 1986). Protein/Protein-Wechselwirkungen (Signalsequenz/Signalsequenzrezeptor) zur Erhöhung der Spezifität der Membranassoziation sind vorstellbar. Bevor die Insertion des Vorstufenproteins in die Membran des endoplasmatischen Retikulums stattfinden kann, muß die an die Membran gebundene Struktur (Abb. 38B, C) entfaltet werden. Die Destabilisierung der Tertiärstruktur wird durch ein cytoplasmatisches Protein mit Hilfe von Nukleosidtriphosphaten katalysiert (Abb. 38B, D). Möglicherweise stellt der NTP-abhängige Mechanismus die Energie für Trennung von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen entgegengesetzt geladenen Aminosäuren bereit. Ohne diese nicht-kovalenten Bindungen bleibt die Konformation des Proteins offenbar flexibel genug, um während des Insertionsvorgangs "passiv", d.h. ohne Katalyse durch eine Proteinkomponente entfaltet zu werden. Die Insertion mag in Art einer Schlaufenbildung zwischen Signalsequenz und einem zunehmenden Anteil des reifen Proteins vom Amino- zum Carboxylende des reifen Teils hin erfolgen. Dies führt zur Präsentation der Spaltstelle auf der luminalen Seite der Membran des endoplasmatischen Retikulums und folglich zur Prozessierung durch die Signalpeptidase (Abb. 38B, D). Der folgende Transfer des reifen Proteins über die Membran des endoplasmatischen Retikulums umfaßt einen oder mehrere Schritt(e). Proteinhaltige Komponenten der Membran könnten dabei wirksam werden (Abb. 38B, E). Bisher wurde eine proteasesensitive Komponente identifiziert, die an der

Freisetzung der hydrophoben Melittin-Domäne aus der Membran des endoplasmatischen Retikulums beteiligt zu sein scheint (Abb. 12, D und E).

4.5. Zum Mechanismus des Transports großer Vorstufenproteine in das endoplasmatische Retikulum

Es stellt sich die Frage, warum SRP, Dockingprotein, Ribosom und Ribosomenrezeptor und in den meisten Fällen auch die Proteinsynthese während des Transports von großen Vorstufenproteinen benötigt werden.

Isoliertes SRP ruft nur im Weizenkeimlysat und nur bei einigen Vorstufenproteinen eine Translationshemmung hervor, nicht dagegen im Kaninchen-Retikulozytenlysate und in aus Säugerzellen abgeleiteten in vitro Systemen (Meyer, 1985). Nach jüngster Auffassung ist die Translationshemmung durch die Inkompatibilität der Komponenten im heterologen in vitro Translations/Transport-System bedingt. Auch scheint ein Elongationsstop oder eine vorübergehende Verlangsamung der Proteinsynthese keine Voraussetzung für den Transport von Vorstufenproteinen über die Membran des endoplasmatischen Retikulums darzustellen: SRP, von dem die für den Translationsarrest verantwortliche Domäne abgespaltet wurde, ermöglicht dennoch den Transport von Proteinen in Mikrosomen (Siegel und Walter, 1985 und 1986). Ferner wurde aus Weizenkeimlysate ein dem SRP ähnliches Ribonukleoproteinpartikel isoliert, das keinerlei Aktivität für Translationsarrest im homologen System besitzt (Pregn et al., 1987). Trotzdem ist die Anwesenheit eines funktionellen SRP/Dockingprotein-Systems Voraussetzung für den Transport der meisten bisher daraufhin untersuchten Vorstufenproteine in Hundepankreas-Mikrosomen.

Eine Rolle von SRP und Dockingprotein bei der spezifischen

Erkennung von Vorstufenproteinen und bei deren Assoziation mit der mikrosomalen Membran wäre denkbar (Gilmore et al., 1984). Vielleicht ist daran auch die Wechselwirkung zwischen Ribosom und Ribosomenrezeptor beteiligt. Die Membranassoziation von großen Vorstufenproteinen, deren Synthese durch SRP gehemmt wurde, hängt zudem von der Anwesenheit von GTP und einem GTP bindenden Protein ab (Conolly und Gilmore, 1986). Dies mag die funktionelle Wechselwirkung zwischen Ribosom und Ribosomenrezeptor widerspiegeln, da auch in anderen Fällen, in denen große Vorstufenproteine mit kovalent gebundener tRNS analysiert wurden, eine Abhängigkeit von Ribosomen und Nukleosidtriphosphaten zu beobachten war (Mueckler und Lodish, 1986a und b; Perara et al., 1986). Unklar ist die Natur des postulierten Ribosomenrezeptors (Hortsch et al., 1986). Die Ribophorine I und II, Glykoproteine der mikrosomalen Membran, (Kreibich et al., 1978) scheinen eher eine Funktion in der Struktur und Morphologie des endoplasmatischen Retikulums als in der Ribosomenbindung zu besitzen (Crimaudo et al., 1987).

Nach Wechselwirkung der Signalsequenz mit SRP und Dockingprotein bindet die Signalsequenz offenbar an spezifische Rezeptoren auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Dadurch wird die Genauigkeit der Signalerkennung möglicherweise aufgrund der Berücksichtigung verschiedener Strukturmerkmale der Signalsequenz erhöht (Wiedmann et al., 1987b; Walter, 1987). Werden Ribosomen durch Behandlung mit Puromycin von der Membran abgelöst, bleiben kurze naszierende Polypeptidketten, die noch nicht in die mikrosomale Membran inseriert sind, mit der Membran assoziiert. Die Resistenz gegenüber alkalischem pH und Harnstoff, sowie die Sensitivität gegenüber Salz sprechen dabei für eine Protein/Protein-Wechselwirkung (Gilmore und Blobel, 1983). Der

Transport von SRP/Dockingprotein-abhängigen Vorstufenproteinen läßt sich durch physiologische Signalpeptide (Majzoub et al., 1980) oder synthetische Consensus-Signalpeptide kompetitiv hemmen (Austen et al., 1984). Durch "Cross Linking" wurden verschiedene Signalpeptid bindende mikrosomale Proteine identifiziert (Robinson et al., 1987). Darüberhinaus konnte der Transport eines großen Vorstufenproteins nach erfolgter Wechselwirkung mit SRP und Dockingprotein durch "Cross Linking" der Signalsequenz mit einem 35kD-Glykoprotein der mikrosomalen Membran angehalten werden (Wiedmann et al., 1987b). Hierbei scheint es sich um ein echtes Intermediat zu handeln, da in Abwesenheit von Mikrosomen "Cross Linking" zwischen Signalsequenz und der 54kD-Untereinheit des SRPs zu beobachten war. Jedoch zeigen "Cross Linking"-Experimente nur die Nähe von molekularen Wechselwirkungen und lassen keine Aussagen über die Spezifizität von Bindungsereignissen zu. Derzeit wird überprüft, ob diese Bindungsstellen auch von kleinen Vorstufenproteinen benutzt werden.

Für die nachfolgenden Schritte der Membraninsertion und des Membrantransfers darf der reife Teil des Vorstufenproteins nur einen sehr geringen Grad an Tertiärstruktur aufweisen (Rothman und Kornberg, 1986). Bei großen Vorstufenproteinen besteht die Möglichkeit der Bildung von ausgedehnten, kompakt gefalteten Domänen innerhalb ihres reifen Teils. Eine Überführung in eine mit der Membraninsertion und/oder dem Membrantransfer zu vereinbarende Struktur erscheint aus energetischen Gründen kaum mehr möglich. Vielleicht sind große Vorstufenproteine deshalb im vollständig synthetisierten Zustand zu diesen Transportschritten nicht mehr in der Lage. Eine Bedeutung des Ribosoms und dessen Membranbindung für den Transport großer Vorstufenproteine in das endoplasmatische Retikulum, womöglich über eine Verhinderung des

Entstehens von ausgeprägten Tertiärstrukturen legten auch Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nahe. Der ursprünglichen Hypothese einer kontinuierlichen Passage des linearen Proteins über die Membran des endoplasmatischen Retikulums (Blobel und Dobberstein, 1975a und b) muß daher jetzt die Möglichkeit der diskontinuierlichen Passage von Domänen mit geringem Grad an Tertiärstruktur gegenübergestellt werden (Zimmermann und Meyer, 1986).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen abschließend folgende vergleichende Betrachtung des Transports von kleinen und großen Proteinen in das endoplasmatische Retikulum zu: Es existieren zwei Mechanismen, die die Fähigkeit von Vorstufenproteinen zur Membranassoziation gewährleisten: Der eine ist unabhängig von SRP und Dockingprotein, aber abhängig von bestimmten strukturellen Voraussetzungen des reifen Teils. Er kommt deshalb wahrscheinlich nur für Proteine mit relativ geringen, funktionell bedingten Anforderungen an die Aminosäuresequenz in Frage. Vorstufenproteine mit einem Molekulargewicht $< 9\text{kD}$ sind in der Lage, eine zur Membranassoziation fähige Konformation ohne Hilfe von SRP und Dockingprotein aufrechtzuerhalten. Der andere Mechanismus ist abhängig von SRP und Dockingprotein, aber unabhängig von der Struktur des reifen Teils. Bei Vorstufenproteinen mit einem Molekulargewicht $> 9\text{kD}$ vermag die Wechselwirkung zwischen Signalsequenz, SRP und Dockingprotein, die Membranassoziation ohne Beteiligung und Einflußnahme des reifen Teils zu vermitteln. Den nachfolgenden Schritten der Membraninsertion bzw. des Membrantransfers liegt bei kleinen und großen Vorstufenproteinen das gemeinsame Prinzip zugrunde, daß sich die reifen Teile nicht in dreidimensionale Strukturen falten dürfen, die thermodynamisch günstig sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden die strukturellen Voraussetzungen des sekretorischen Proteins Prepromelittin der Honigbiene für die Unabhängigkeit von SRP und Dockingprotein charakterisiert. Die sich daraus ergebenden Konsequenzen für den Transportmechanismus im Hinblick auf den Energiebedarf und die positive oder negative Rolle von bestimmten Konformationen des Vorstufenproteins wurden näher untersucht. Dabei wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

1A) Die Signalsequenz von Prepromelittin ist in der Lage, mit SRP und Dockingprotein zu interagieren. Diese Interaktion ist Voraussetzung für den Transport von größeren, diese Signalsequenz besitzenden Vorstufenproteinen, nicht jedoch für Prepromelittin selbst und die davon abgeleiteten kleinen Vorstufenproteine. Die kritische Größe von Vorstufenproteinen für Unabhängigkeit von SRP und Dockingprotein liegt zwischen 78 und 84 Aminosäuren.

1B) Die positiv geladenen Aminosäuren am Carboxylende von Prepromelittin müssen durch negativ geladene Aminosäuren innerhalb der Prosequenz ausgeglichen werden, um mit dem Transport in Mikrosomen vereinbar zu sein.

1C) Die hydrophobe Domäne innerhalb des reifen Melittins spielt keine Rolle für die SRP/Dockingprotein-unabhängige Insertion von Prepromelittin in die mikrosomale Membran. Sie erfordert jedoch zu ihrem Transfer über die mikrosomale Membran die Anwesenheit einer proteasesensitiven Komponente der Mikrosomen.

1D) Grundsätzlich kann eine Signalsequenz den Transport von kleinen Vorstufenproteinen in Mikrosomen unabhängig von SRP und Dockingprotein vermitteln, falls die Verteilung von geladenen

Aminosäuren innerhalb des reifen Teils des Vorstufenproteins gewissen Regeln folgt: Die beiden Enden des reifen Teils dürfen entweder keine geladenen Aminosäuren besitzen oder geladene Aminosäuren an einem Ende des reifen Teils müssen durch entgegengesetzt geladene Aminosäuren am anderen Ende ausgeglichen werden.

Die strukturellen Voraussetzungen hinsichtlich der Ladungsverteilung sind mit einer "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils als Bestandteil der transportkompetenten Konformation kleiner Vorstufenproteine vereinbar.

2) Der reife Teil von größeren Vorstufenproteinen (MG >9kD) unterliegt dagegen keinen strukturellen Einschränkungen im Hinblick auf den SRP/Dockingprotein-abhängigen Transport in Mikrosomen.

3A) Die Möglichkeit zur Ausbildung einer Disulfidbrücke im reifen Teil bestätigt die Fähigkeit von SRP/Dockingprotein-unabhängigen Vorstufenproteinen zur Bildung einer "Haarnadel-Struktur". Vorstufenproteine mit einer Disulfidbrücke im reifen Teil werden jedoch nicht in Mikrosomen transportiert. Die Ursache für diese Hemmung liegt nicht in der Disulfidbindung selbst, sondern in der Stabilisierung der "Haarnadel-Struktur" des Vorstufenproteins durch die Disulfidbrücke.

3B) Die Entkoppelung der Assoziation von kleinen Vorstufenproteinen mit der mikrosomalen Membran von der nachfolgenden Insertion in die mikrosomale Membran zeigt die Vereinbarkeit der "Haarnadel-Struktur" des reifen Teils von kleinen Vorstufenproteinen mit der Membranassoziation, nicht jedoch mit der Membraninsertion. Die Insertion der kleinen Vorstufenproteine in Detergismizellen ist ebenfalls nicht mit der Anwesenheit einer

Disulfidbrücke im reifen Teil vereinbar.

3C) Die Insertion der meisten kleinen Vorstufenproteine in Mikrosomen oder Detergensmizellen erfordert Nukleosidtriphosphate, sowie eine Komponente des Retikulozytenlysats. Eine Ausnahme bilden Vorstufenproteine, die keine geladenen Aminosäuren an den beiden Enden ihres reifen Teils besitzen. Die Assoziation mit der mikrosomalen Membran erfolgt bei allen kleinen Vorstufenproteinen auch in Abwesenheit von Nukleosidtriphosphaten.

Daraus folgt, daß eine - mit der Membranassoziation zu vereinbarende und möglicherweise dafür erforderliche - Struktur des reifen Teils kleiner Vorstufenproteine in eine andere - mit der nachfolgenden Membraninsertion zu vereinbarende und einen geringeren Grad an Tertiärstruktur aufweisende - Struktur überführt werden muß. Offenbar sind hierzu Nukleosidtriphosphate und eine Komponente des Retikulozytenlysats erforderlich.

4) Untersuchungen zum Transportverhalten von großen Vorstufenproteinen deuten auf eine Beteiligung der Ribosomen am Transport von SRP/Dockingprotein-abhängigen Vorstufenproteinen hin. Diese liegt nicht in der Koppelung von Synthese und Transport. Möglicherweise ist auch bei großen Vorstufenproteinen die Verhinderung einer Konformation mit hohem Grad an Tertiärstruktur Voraussetzung für den Transport in das endoplasmatische Retikulum. Dabei könnten die Ribosomen eine Rolle spielen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ainger, K.J. und Meyer, D.I. (1986) Translocation of nascent secretory proteins across membranes can occur late in translation. EMBO J., 5, 951-955.
- Argan, C., Lusty, C. J. und Shore, G. C. (1983) Membrane and cytosolic components affecting transport of the precursor for ornithine carbamyltransferase into mitochondria. J. Biol. Chem., 258, 6667-6670.
- Argan, C. und Shore, G. C. (1985) The precursor to ornithine carbamyl transferase is transported to mitochondria as a 5S complex containing import factor. Biochem. Biophys. Res. Commun., 131, 289-298.
- Asbeck, F., Beyreuther, K., Köhler, H., von Wettstein, G. und Braunitzer, G. (1969) Die Konstitution des Hüllproteins des Phagen fd. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 350, 1047-1066.
- Austen, B. M., Hermon-Taylor, J., Kaderbhai, M. A. und Ridd, D. H. (1984) Design and synthesis of a consensus signal sequence that inhibits protein translocation into rough microsomal vesicles. Biochem. J., 224, 317-325.
- Beckwith, J. und Ferro-Novick, S (1986) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 125, 5-27.
- Bellion, G. und Goodman, J. M. (1987) Proton ionophores prevent assembly of a peroxisomal protein. Cell, 48, 165-173.
- Bello, J., Bello, H. R. und Granados, E. (1982) Conformation and aggregation of melittin: Dependence on pH and concentration. Biochemistry, 21, 461-465.
- Bergman, L. W. und Kuehl, W. M. (1979) Formation of an intrachain disulfide bond on nascent immunoglobulin light chains. J. Biol. Chem., 254, 8868-8874.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523.
- Bitter, G. A., Kenneth, K. C., Banks, A. R. und Lai, P.-H. (1984) Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae*, directed by -factor gene fusions. Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 5330-5334.
- Blobel, G. und Sabatini, D.D. (1970) Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. I. Location of the polypeptides within ribosomes. J. Cell Biol., 45, 130-145.
- Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes 1. J. Cell Biol., 67, 835-851.

- Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes 2. J. Cell Biol., 67, 852-862.
- Blobel, G. (1980) Intracellular protein topogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1496-1500.
- Bretscher, M. S. (1976) Directed lipid flow in cell membranes. Nature, 260, 21-23.
- Caulfield, M. P., Duong, L. T. und Rosenblatt, M. (1986) Demonstration of posttranslational secretion of human placental lactogen by a mammalian *in vitro* translation system. J. Biol. Chem., 261, 10935-10956.
- Chaconas, G. und van de Sande, J. H. (1980) 5'-³²P labeling of RNA and DNA restriction fragments. Methods Enzymol., 65, 75-88.
- Chamberlain, J. P. (1979) Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. Anal. Biochem., 98, 132-135.
- Chen, E. J. und Seeburg, P. H. (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. DNA, 4, 165-170.
- Chen, L. und Tai, P. C. (1985) ATP is essential for protein translocation in *E. coli* membrane vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4384-4388.
- Chen, W.-J. und Douglas, M. G. (1987) Phosphodiester bond cleavage outside mitochondria is required for the completion of protein import into the mitochondrial matrix. Cell, 49, 651-658.
- Chou, P. Y. und Fasman, C. D. (1978) Empirical predictions of protein conformation. Ann. Rev. Biochem., 47, 251-276.
- Chua, N.-H. und Schmidt, G. W. (1979) Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts. J. Cell Biol., 81, 461-483.
- Cline, K., Werner-Washburne, M., Lubben, T. H. und Keegstra, K. (1985) Precursors to two nuclear-encoded chloroplast proteins bind to the outer envelope membrane before being imported into chloroplasts. J. Biol. Chem., 260, 3691-3696.
- Conolly, T. und Gilmore, R. (1986) Formation of a functional ribosome-membrane junction during translocation requires the participation of a GTP-binding protein. J. Cell Biol., 103, 2253-2261.
- Creighton, T. E., Hillson, D. A. und Freedman, R. B. (1980) Catalysis by protein-disulphide isomerase of the unfolding and refolding of proteins with disulphide bonds. J. Mol. Biol., 142, 43-62.

- Crimaudo, C., Hortsch, M., Gausepohl, H. und Meyer, D. I. (1987) Human ribophorins I and II: the primary structure and membrane topology of two highly conserved rough endoplasmic reticulum-specific glycoproteins. EMBO J., 6, 75-82.
- Crooke, E. und Wickner, W. (1987) The trigger factor: A soluble protein which folds pro-ompA into a membrane assembly competent form. Science, im Druck.
- Date, T., Zwisinski, C., Ludmerer, S. und Wickner, W. (1980) Mechanism of membrane assembly: Effects of energy poisons on the conversion of soluble M13 coliphage procoat to membrane-bound coat protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 827-831.
- Davis, N. G. und Hsu, M.-C. (1986) The fusion-related hydrophobic domain of Sendai F protein can be moved through the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5091-5095.
- Davis, N. G. und Model, P. (1985) An artificial anchor domain: hydrophobicity suffices to stop transfer. Cell, 41, 607-614.
- Dowhan, W., Bibus, C. R. and Schatz, G. (1985) The cytoplasmically-made subunit IV is necessary for assembly of cytochrome c oxidase in yeast (1985) EMBO J., 4, 179-184.
- Drake, A. F. und Hider, R. C. (1979) The structure of melittin in lipid bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta, 555, 371-373.
- Dretzen, G., Bellard, P., Sassoni-Corsi, P. und Chambon, P. (1981) A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal. Biochem., 112, 295-298.
- Drouin, J., (1980) Cloning of human mitochondrial DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 140, 15-27.
- Duffaud, G. D., Lehnhardt, S. K., March, P. E. und Inouye, M. (1985) Structure and function of the signal peptide. Current topics in membranes and transport, 24, 65-103, Academic Press, New York.
- Dugaiczky, A., Boyer, H. W. und Goodman, H. M. (1975) Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. J. Mol. Biol., 96, 171-182.
- Eilers, M. und Schatz, G. (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor into mitochondria. Nature, 322, 549-552.
- Eilers, M., Oppliger, W. und Schatz, G. (1987) Both ATP and an energized inner membrane are required to import a purified precursor protein into mitochondria. EMBO J., 6, 1073-1077.
- Engelman, D. M. und Steitz, T.A. (1981) The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: The helical hairpin hypothesis. Cell, 23, 411-422.

- Evans, E., Gilmore, R. und Blobel, G. (1986) Purification of microsomal signal peptidase as a complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 581-585.
- Faucou, J. F., Dufourcq, J. und Lussan, C. (1979) The self-association of melittin and its binding to lipids. An intrinsic fluorescence polarization study. FEBS Lett., 102, 187-190.
- Firgaira, F. A., Hendrick, J. P., Kalousek, F., Kraus, J. P. und Rosenberg, L. E. (1984) RNA required for import of precursor proteins into mitochondria. Science, 226, 1319-1322.
- Flügge, U. I. und Hinz, G. (1986) Energy dependence of protein translocation into chloroplasts. Eur. J. Biochem., 160, 563-570.
- Freitag, H., Janes, M. und Neupert, W. (1982) Biosynthesis of mitochondrial porin and insertion into the outer mitochondrial membrane of *Neurospora crassa*. Eur. J. Biochem., 126, 197-202.
- Friedlander, M. und Blobel, G. (1985) Bovine opsin has more than one signal sequence. Nature, 318, 338-343.
- Fritz, H.-J., Hohlmaier, J., Kramer, W., Ohmayer, A. und Wippler, J. (1987) im Druck.
- Galili, G., Kawata, E. E., Cuellar, R. E., Smith, L.D. und Larkins, B.A., (1986) Synthetic oligonucleotide tails inhibit *in vitro* and *in vivo* translation of SP6 transcripts of maize zein cDNA clones. Nucleic Acids Res., 14, 1511-1524.
- Garoff, H. und Ansorge, W. (1981) Improvement of DNA sequencing gels. Anal. Biochem., 115, 450-457.
- Geller, B. L., Movva, N. R. und Wickner, W. (1986) Both ATP and the electrochemical potential are required for optimal assembly of pro-ompA into E.coli inner membrane vesicles. Proc. Natl. Sci. Acad. Sci. USA, 83, 4219-4222.
- Georghiou, S., Thompson, M. und Mukhopadhyay, A. K. (1982) Melittin-phospholipid interaction studied by employing the single tryptophan residue as an intrinsic fluorescent probe. Biochim. Biophys. Acta, 688, 441-452.
- Gilbert, J. M. und Anderson, W. F. (1971) tRNA dependent cell-free hemoglobin synthesis. Meth. Enzymol., XX, 542-549.
- Gilmore, R., Blobel, G. und Walter, P. (1982a) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. J. Cell Biol., 95, 463-469.
- Gilmore, R., Blobel, G. und Walter, P. (1982b) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. J. Cell Biol., 95, 470-477.

- Gilmore, R. und Blobel, G. (1983) Transient involvement of signal recognition particle and its receptor in the microsomal membrane prior to protein translocation. Cell, 35, 677-688.
- Gilmore, R., Walter, P., Anderson, D., Erickson, A., Müller, M. und Blobel, G. (1984) The mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. Protein Transport and Secretion, 291-296.
- Gilmore, R. und Blobel, G. (1985) Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants. Cell, 23, 411-422.
- Goldman, B. M. und Blobel, G. (1978) Biogenesis of peroxisomes: Intracellular site of synthesis of catalase and uricase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5066-5070.
- Goodman, J. M., Watts, C. und Wickner, W. (1981) Membrane assembly: Post-translational insertion of M13 procoat protein into E.coli membranes and its conversion to coat protein in vitro. Cell, 24, 437-441.
- Grossmann, A., Bartlett, S. und Chua, N.-H. (1980) Energy-dependent uptake of cytoplasmically synthesized polypeptides by chloroplasts. Nature, 285, 625-628.
- Grunstein, M. und Hogness, D. S. (1975) Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961-3964.
- Guo, L., Yang, R. C. A. und Wu, R. (1983) An improved strategy for rapid sequencing of both strands of long DNA molecules cloned in a plasmid. Nucleic Acids Res., 11, 5521-5539.
- Haberman, E. (1972) Bee and wasp venoms. Science, 177, 314-318.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol., 166, 557-580.
- Hansen, W., Garcia, P. D. und Walter, P. (1986) In vitro protein translocation across the yeast endoplasmic reticulum: ATP-dependent post-translational translocation of the prepro- -factor. Cell, 45, 397-406.
- Harrison, B. und Zimmermann, S. B. (1986) Stabilization of T4 polynucleotide kinase by macromolecular crowding. Nucleic Acids Res., 14, 1863-1870.
- Hennig, B. und Neupert, W. (1981) Assembly of cytochrome c. Apocytochrome c is bound to specific sites on mitochondria before its conversion to holocytochrome c. Eur. J. Biochem., 91, 609-620.
- Hennig, B. und Neupert, W. (1983) Biogenesis of cytochrome c in *Neurospora crassa*. Methods Enzymol., 97, 261-274.

- Hortsch, M., Avossa, D. und Meyer, D. I. (1986) Characterization of secretory protein translocation: ribosome-membrane interaction in endoplasmic reticulum. J. Cell Biol., 103, 241-253.
- Hortsch, M. und Meyer, D. I. (1984) Pushing the signal hypothesis: What are the limits? Biol. Cell, 52, 1-8.
- Hoober, J. K., Marks, D.B., Keller, B. J. und Margulies, M. M. (1982) Regulation of the accumulation of the major thylakoid polypeptides in *Chlamydomonas reinhardtii* γ -1 at 25°C and 38°C. J. Cell Biol., 95, 552-558.
- Hunt, T. und Jackson, R. J. (1974) The rabbit reticulocyte lysate as a system for studying mRNA. Modern Trends in Human Leukaemia: Biological, Biochemical and Virological Aspects (Neth, R., Gallo, R. C., Spiegelman, S. und Stohlmann, F. Jr. eds.) J. F. Lehmanns Verlag, München, 300-307.
- Hurt, E. C., Pesolt-Hurt, B. und Schatz, G. (1984) The cleavable presequence of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. FEBS LETT., 178, 306-310.
- Hurt, E. C., Pesold-Hurt, B., Suda, K., Oppliger, W. und Schatz, G. (1985) The first twelve amino acids (less than half of the pre-sequence) of an imported mitochondrial protein can direct mouse cytosolic dihydrofolate reductase into the yeast mitochondrial matrix. EMBO J., 4, 2061-2068.
- Ibrahimi, I., Cutler, D., Stueber, D. und Bujard, H. (1986) Determinants for protein translocation across mammalian endoplasmic reticulum. Membrane insertion of truncated and full-length prelysozyme molecules. Eur. J. Biochem., 155, 571-576.
- Inouye, S., Soberon, X., Franceschini, T., Nakamura, K., Itakura, K. und Inouye, M. (1982) Role of positive charge on the amino-terminal region of the signal peptide in protein secretion across the membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3438-3441.
- Inouye, S., Wang, S., Sekizawa, J., Halegoua, S. und Inouye, M. (1977) Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the *E. coli* outer membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1004-1008.
- Ito, K., Date, T. und Wickner, W. (1980) Synthesis, assembly into the cytoplasmic membrane, and proteolytic processing of the precursor of coliphage M13 coat protein. J. Biol. Chem., 255, 2123-2130.
- Jackson, R. D. und Blobel, G. (1977) Posttranslational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5598-5602.

- Jaenicke, R. und Rudolph, R. (1986) Refolding and association of oligomeric proteins. Methods Enzymol., 131, 218-250.
- Kaderbhai, M. A. and Austen, B. M. (1985) Studies on the formation of intrachain disulphide bonds in newly biosynthesized bovine prolactin. Role of protein-disulphide isomerase. Eur. J. Biochem., 153, 167-178.
- Kauzmann, W. (1987) Thermodynamics of unfolding. Nature, 325, 763-764.
- Kedes, L. H., Chang, A. C. Y., Hauseman, D. und Cohen, S. N. (1975) Isolation of histone genes from unfractionated sea urchin DNA by subculture cloning in E.coli. Nature, 255, 533-538.
- Kempf, C., Klausner, R. D., Weinstein, J. N., Van Renswoude, J., Pincus, M. und Blumenthal, R. (1982) Voltage-dependent trans-bilayer orientation of melittin. J. Biol. Chem., 257, 2469-2476.
- Klenow, H. and Henningsen, I. (1970) Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* β by limited proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 65, 168-172.
- Klingenberg, M., Aquila, H. und Riccio, P. (1978) Isolation of functional membrane proteins to or identical with the ADP.ATP carrier of mitochondria. Meth. Enzymol. LVI, 407-414.
- Kornfeld, R. und Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Ann. Rev. Biochem., 45, 631-664.
- Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.-W., Kramer, B., Pflugfelder, M. und Fritz, H.-J. (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide directed mutation construction. Nucleic Acids Res., 12, 9441-9456.
- Kreibich, G., Ulrich, B. L. und Sabatini, D. D. (1978) Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. I. Identification of ribophorins I and II, membrane proteins characteristic of rough microsomes. J. Cell Biol., 77, 464-487.
- Kreil, G. (1984) Structure and multistep activation of the precursors of peptides from honeybee venom glands and frog skin. Curr. Top. Cell. Regul., 24, 261-272.
- Kreil, G., Haiml, L. und Suchanek, G. (1980a) Stepwise cleavage of the propart of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. Evidence for a new type of precursor-product conversion. Eur. J. Biochem., 111, 49-58.
- Kreil, G., Mollay, C., Kaschnitz, R., Haiml, G. und Vilas, U. (1980b) Ann. N.Y. Acad. Sci., 343, 338-346.
- Krieg, P. A. und Melton, D. A. (1984) Functional mRNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. Nucleic Acids Res., 12, 7057-7070.

- Krieg, U. C., Walter, P. and Johnson, A. E. (1986)
Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8604-8608.
- Kuhn, A., Kreil, G. und Wickner, W. (1986a) Both hydrophobic domains of M13 procoat are required to initiate membrane insertion. EMBO J., 5, 3681-3686.
- Kuhn, A., Wickner, W. und Kreil, G. (1986b) The cytoplasmic carboxy terminus of M13 procoat is required for the membrane insertion of the central domain. Nature, 322, 335-339.
- Kurzchalia, T.V., Wiedmann, M., Girshovich, A. S.,
Bochkareva, E. S., Bielka, H. und Rapoport, T. A. (1986)
The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle.
Nature, 320, 634-636.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227, 680-685.
- Lambert, N. and Freedman, R. B. (1985) The latency of rat liver microsomal protein disulphide-isomerase.
Biochem. J., 228, 635-645.
- Lau, P. P. und Gray, H. B. Jr. (1979) Extracellular nucleases of *Alteromonas espejiana* Bal31. IV. The single strand specific deoxyribonuclease activity as a probe for regions of altered secondary structure in negatively and positively supercoiled closed circular DNA. Nucleic Acids Res., 6, 331-339.
- Lauffer, L., Garcia, P. D., Harkins, R. N., Coussens, L.,
Ullrich, A. und Walter, P. (1985) Topology of SRP receptor in the endoplasmic reticulum membrane. Nature, 318, 334-338.
- Levinson, A., Silver, D. und Seed, B. (1984)
J. Mol. Appl. Gen., 2, 507-517.
- Lewis, M. J. und Pelham, H. R. B. (1985) Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70kD heat shock protein. EMBO J., 4, 3137-3143.
- Lingappa, V. R., Chaidez, J., Yost, C. S. und Hedgpeth, J. (1984)
Determinants of protein localization: β -lactamase signal sequence directs globin across microsomal membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 456-460.
- Lodish, H. F. und Rothman, J. E. (1979) Die Bildung von Zellmembranen. Spektrum der Wissenschaft, 3, 30-47.
- Macchecchini, M.-L., Rudin, Y., Blobel, G. und Schatz, G. (1979)
Import of proteins into mitochondria. Precursor forms of the extramitochondrially made F_1 -ATPase subunits in yeast.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 343-347.

- Maher, P. S. und Singer, S. J. (1986) Disulfide bonds and the translocation of proteins across membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 9001-9005.
- Majzoub, J. H., Rosenblatt, M., Fennick, B., Marnus, R., Kronenberg, H. M., Potts, J. T. Jr. and Habener, J. F. (1980) Synthetic preproparathyroid hormone leader sequence inhibits cell-free processing of placental parathyroid and pituitary prehormones. J. Biol. Chem., 255, 11478-11483.
- Malkins, L. I. and Rich, A. (1967) Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. J. Mol. Biol., 26, 329-346.
- Mandel, M. und Higa, M. (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol., 53, 159-162.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Maniatis, T., Kee, S. G., Efstratiadis, A. und Kafatos, F. C. (1976) Amplification and characterization of a β -globin gene synthesized *in vitro*. Cell, 8, 163-182.
- McDonnel, M. W., Simon, M. N. und Studier, F. W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J. Mol. Biol., 110, 119-126.
- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M. R. (1984) Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. Nucleic Acids Res., 12, 7035-7056.
- Meyer, D. I. (1985) Signal recognition particle (SRP) does not mediate a translational arrest of nascent secretory proteins in mammalian cell-free systems. EMBO J., 4, 2031-2033.
- Meyer, D. I. und Dobberstein, B. (1980) A membrane component essential for vectorial translocation of nascent proteins across the endoplasmic reticulum: requirements for its extraction and reassociation with the membrane. J. Cell Biol., 87, 498-502.
- Meyer, D. I., Krause, E. und Dobberstein, B. (1982) Secretory protein translocation across membranes - the role of the docking protein. Nature, 297, 647-650.
- Mills, E. N. C., Lambert, N. und Freedman, R. B. (1983) Identification of protein disulphide-isomerase as a major acidic polypeptide in rat liver microsomal membranes. Biochem. J., 213, 245-248.
- Milstein, C., Brownlee, G. G. und Harrison, T. M. (1972) A possible precursor of immunoglobulin light chains. Nature New Biol., 239, 117-120.

- Miura, S., Mori, M. und Tatibana, M. (1983) Transport of ornithine carbamoyl-transferase precursor into mitochondria. Stimulation by potassium ion, magnesium ion, and a reticulocyte cytosolic protein(s). J. Biol. Chem., 258, 6671-6674.
- Mollay, C., Kreil, G. und Berger, H. (1979) Action of phospholipases on the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Stimulation by melittin. Biochim. Biophys. Acta, 426, 317-324.
- Mollay, C., Vilas, U. und Kreil, G. (1982) Cleavage of honeybee prepromelittin by an endoprotease from rat liver microsomes: Identification of intact signal peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2260-2263.
- Morre, D. J., Kartenbeck, J. und Franke, W. W. (1979) Membrane flow and interconversions among endomembranes. Biochem. Biophys. Acta, 559, 71-152.
- Mostov, K. E., DeFoor, P., Fleischer, S. und Blobel, G. (1981) Cotranslational membrane integration of calcium pump protein without signal sequence cleavage. Nature, 292, 87-88.
- Mueckler, M. und Lodish, H. F. (1986a) The human glucose transporter inserts posttranslationally into microsomes. Cell, 44, 629-637.
- Mueckler, M. und Lodish, H. F. (1986b) Post-translational insertion of a fragment of the glucose transporter into microsomes requires phosphoanhydride bond cleavage. Nature, 322, 549-552.
- Müller, M., and Blobel, G. (1984) Protein export in *E. coli* requires a soluble activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7737-7741.
- Nakashima, Y. und Konigsberg, W. (1974) Reinvestigation of a region of the fd bacteriophage coat protein sequence. J. Mol. Biol., 88, 598-600.
- Neupert, W. und Schatz, G. (1981) How proteins are transported into mitochondria. Trends Biochem. Sci., 6, 1-4.
- Nicholson, D. W., Köhler, H. und Neupert, W. (1987) Import of cytochrome c into mitochondria. Cytochrome c heme lyase. Eur. J. Biochem., 165, 147-157.
- Noll, M. (1974) Subunit structure of chromatin. Nature, 251, 249-251.
- Nunberg, J. H., Kaufman, R. J. Chang, A. C. Y., Cohen, S. N. und Schinke, R. T. (1980) Structure and genomic organization of the mouse dihydrofolate reductase gene. Cell, 19, 355-364.
- O'Farrell, P. H., Kutter, E. und Nalcanishi, M. (1980) A restriction map of the bacteriophage T4 genome. Mol. Gen. Genet., 179, 421-432.

- Ohba, H., Harano, T. und Omura, T. (1981) Intracellular and intramembraneous localization of a protein disulfide isomerase in rat liver. J. Biochem., 89, 889-900.
- Ohno-Iwashita, Y. und Wickner, W. (1984) Reconstitution of rapid and assymmetric assembly of M13 procoat protein into liposomes which have bacterial leader peptidase. J. Biol. Chem., 258, 1895-1900.
- Ohno-Iwashita, Y., Wolfe, P., Ito, K. und Wickner W. (1984) Processing of pre-proteins by liposomes bearing leader peptidase. Biochemistry, 23, 6178-6184.
- Ohta, S. und Schatz, G. (1984) A purified precursor polypeptide requires a cytoplasmic protein fraction for import into mitochondria. EMBO J., 3, 651-657.
- Oliver, D. B. und Beckwith, J. (1982) Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. Cell, 30, 311-319.
- Pain, D. und Blobel, G. (1987) Protein import into chloroplasts requires a chloroplast ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3288-3292.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science, 189, 347-358.
- Palade, G. (1983) Membrane biogenesis: An overview. Methods Enzymol., 96, xxiv-liv.
- Palmiter, R. D., Gagnon, J., Ericsson, L. H. und Walsh, K. A. (1977) Precursor of egg white lysozyme. J. Biol. Chem., 252, 6386-6393.
- Palmiter, R. D., Gagnon, J. und Walsh, K. A. (1978) Ovalbumin: A secreted protein without a transient hydrophobic leader sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 94-98.
- Paterson, R. G. und Lamb, R. A. (1987) Ability of the hydrophobic fusion-related external domain of a Paramyxovirus F protein to act as a membrane anchor. Cell, 48, 441-452.
- Pelham, H. R. B. und Jackson, R. J. (1976) An efficient mRNA dependent translational system from the reticulocyte lysate. Eur. J. Biochem., 67, 247-256.
- Pelham, H. R. B. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. Cell, 46, 956-961.
- Perara, E., Rothman, R. E. und Lingappa, V. R. (1986) Uncoupling translocation from translation: Implications for transport of proteins across membranes. Science, 232, 348-352.
- Perlman, D. und Halvorson, H. O. (1983) A putative signal peptidase recognition site and sequence in eucaryotic and procaryotic signal peptides. J. Mol. Biol., 167, 391-409.

- Peters, T. Jr. und Davidson, L. K. (1982) The biosynthesis of rat serum albumin. J. Biol. Chem., 257, 8847-8853.
- Pigiet, V. P. and Schuster, B. J. (1986) Thioredoxin-catalyzed refolding of disulfide-containing proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7643-7647.
- Pfaller, R., Freitag, H., Harmey, M. A., Benz, R. und Neupert, W. (1985) A water-soluble form of porin from the mitochondrial outer membrane of *Neurospora crassa*. Properties and relationship to the biosynthetic precursor form. J. Biol. Chem., 260, 8188-8193.
- Pfaller, R. und Neupert, W. (1987) High-affinity binding sites involved in the import of porin into mitochondria. EMBO J., 6, 2635-2642.
- Pfanner, N. und Neupert, W. (1986) Transport of F_1 -ATPase subunit β into mitochondria depends on both a membrane potential and nucleoside triphosphates. FEBS Lett., 209, 152-156.
- Pfanner, N. und Neupert, W. (1987) Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. J. Biol. Chem., 262, 7528-7536.
- Pfanner, N., Müller, H. K., Harmey, M. A. und Neupert, W. (1987a) Mitochondrial protein import: involvement of the mature part of a cleavable precursor protein in the binding to receptor sites. EMBO J., 6, 3449-3454.
- Pfanner, N., Tropschug, M. und Neupert, W. (1987b) Mitochondrial protein import: Nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. Cell, 49, 815-823.
- Pheiffer, B. H. and Zimmerman, S. B. (1983) Polymer-stimulated ligation: Enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 ligase in polymer solutions. Nucleic Acids Res., 11, 7853-7871.
- Prehn, S., Wiedmann, M., Rapoport, T. A. und Zwieb, C. (1987) Protein translocation across wheat germ microsomal membranes requires an SRP-like component. EMBO J., 6, 2093-2097.
- Purvis, I. J., Bettany, A. J. E., Chinnappan Santiago, T., Coggins, J. R., Duncan, K., Eason, R. und Brown, A. J. P. (1987) The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation *in vivo* - A hypothesis. J. Mol. Biol., 193, 413-417.
- Radloff, R., Bauer, W. und Vinograd, J. (1967) A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular duplex DNA in HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57, 1514-1521.
- Randall, L. L. (1983) Translocation of domains of nascent periplasmic proteins across the cytoplasmic membrane is independent of elongation. Cell, 33, 231-240.

- Randall, L. L. und Hardy, S. J. S. (1986) Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: A study *in vivo* of maltose-binding protein of *E. coli*. Cell, 46, 921-928.
- Rapoport, T. A. and Wiedmann, M. (1985) Application of the signal hypothesis to the incorporation of integral membrane proteins. Annual review of cell biology 1985, chapter 1, 1-63.
- Rees-Jones, R. and Al-Awqati, R. (1984) Proton-translocation adenosinetriphosphatase in rough and smooth microsomes from rat liver. Biochemistry, 23, 2236-2240.
- Richardson, C. C. (1971) Polynucleotide kinase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. Proc. Nucleic. Acid Res., 2, 815-822.
- Riezman, H., Hay, R., Witte, C., Nelson, N. und Schatz, G. (1983) Yeast mitochondrial outer membrane specifically binds cytoplasmically-synthesized precursors of mitochondrial proteins. EMBO J., 2, 1113-1118.
- Robinson, A., Kaderbhai, M. A. und Austen, B. M. (1987) Identification of signal sequence binding proteins integrated into the rough endoplasmic reticulum membrane. Biochem. J., 242, 767-777.
- Roth, J. (1984) Cytochemical localization of terminal N-acetyl-D-galactosamine residues in cellular compartments of intestinal goblet cells: Implication for the topology of O-glycosylation. J. Cell Biol., 98, 399-406.
- Roth, R. A. und Koshland, M. E. (1981) Role of disulfide interchange enzyme in immunoglobulin synthesis. Biochemistry, 20, 6594-6599.
- Rothblatt, J. A. und Meyer, D. I. (1986a) Secretion in yeast: reconstitution of the translocation and glycosylation of -factor and invertase in a homologous cell-free system. Cell, 44, 619-628.
- Rothblatt, J. A. und Meyer, D. I. (1986b) Secretion in yeast: Translocation and glycosylation of prepro- -factor *in vitro* can occur via an ATP-dependent post-translational mechanism. EMBO J., 5, 1031-1036.
- Rothblatt, J. A., Webb, J. R., Ammerer, G. und Meyer, D. I. (1987) Secretion in yeast: structural features influencing the posttranslational translocation of prepro- -factor *in vitro*. EMBO J., 6, 3455-3463.
- Rothman, J. E. und Kornberg, R. D. (1986) An unfolding story of protein translocation. Nature, 322, 209-210.
- Rothman, J. E. und Lenard, J. (1977a) Membrane assymetry. The nature of membrane assymetry provides clues to the puzzle of how membranes are assembled. Science, 195, 743-753.

- Rothman, J. E. and Lenard, J. (1977b) Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. Nature, 269, 775-780.
- Rottier, P., Armstrong, J. und Meyer, D. J. (1985) Signal recognition particle-dependent insertion of Coronavirus E₁, an intracellular membrane glycoprotein. J. Biol. Chem., 260, 4648-4652.
- Sabatini, D. D., Kreibich, G., Morimoto, T. and Adesnik, M. (1982) Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. J. Cell Biol., 92, 1-22.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467.
- Schatz, G. (1979) How mitochondria import proteins from the cytoplasm. FEBS Lett., 103, 203-211.
- Schatz, G. und Mason, T. L. (1974) The biosynthesis of mitochondrial proteins. Ann. Rev. Biochem., 43, 51-87.
- Scheele, G. and Jacoby, R. (1982) Conformational changes associated with proteolytic processing of presecretory proteins allow glutathione-catalyzed formation of native disulfide bonds. J. Biol. Chem., 257, 12277-12282.
- Schlenstedt, G. und Zimmermann, R. (1987) Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. EMBO J., 6, 699-703.
- Schleyer, M., Schmidt, B. und Neupert, W. (1982) Requirements of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. Eur. J. Biochem., 125, 109-116.
- Schleyer, M. und Neupert, W. (1984) Transport of ADP/ATP carrier into mitochondria: precursor imported *in vitro* acquires functional properties of the mature protein. J. Biol. Chem., 259, 3487-3491.
- Schleyer, M. und Neupert, W. (1985) Transport of proteins into mitochondria: Translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. Cell, 43, 339-350.
- Schulze, J., Mischek, U., Wigand, S. und Galla, H.-J. (1987) Incorporation of highly purified melittin into phosphatidylcholine bilayer vesicles. Biochim. Biophys. Acta, 901, 101-111.
- Siegel, V. und Walter, P. (1985) Elongation arrest is not a prerequisite for secretory protein translocation across the microsomal membrane. J. Cell Biol., 100, 1913-1921.
- Siegel, V. und Walter, P. (1986) Removal of the Alu structural domain from signal recognition particle leaves its protein translocation activity intact. Nature, 320, 81-84.

- Singer, S. J. (1977) Thermodynamics, the structure of integral membrane proteins, and transport.
J. Supramolec. Struct. 6, 313-323.
- Singer, S. J. und Nicolson G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of orientated globular proteins and lipids. Science, 175, 720-731.
- Small, G. M., Imanaka, T., Shio, H. und Lazarow, P. B. (1987) Efficient association of *in vitro* translation products with purified, stable *Candida tropicalis* peroxisomes.
Mol. Cell. Biol., 7, 1848-1855.
- Smith, H. O. (1980) Recovery of DNA from gels.
Methods Enzymol., 65, 371-389.
- Snyder, G. H. (1987) Intramolecular disulfide loop formation in a peptide containing two cysteines. Biochemistry, 26, 688-694.
- Spiess, M. and Lodish, H. F. (1986) An internal signal sequence: The asialoglycoprotein receptor membrane anchor.
Cell, 44, 177-185.
- Steiner, D. F., Quinn, P. S., Chan, S. J., Marsh, J. und Tager, H. S. (1980) Processing mechanism in the biosynthesis of proteins. Ann. NY Acad. Sci., 343, 1-16.
- Stuart, R. A., Neupert, W. und Tropschug, M. (1987) Deficiency in mRNA splicing in a cytochrome c mutant of *Neurospora crassa* : importance of carboxy terminus for import of apocytochrome c into mitochondria. EMBO J., 6, 2131-2137.
- Stueber, D., Ibrahimi, I., Cutler, D., Dobberstein, B. und Bujard, H. (1984) A novel *in vitro* transcription-translation system: accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned cDNA sequences. EMBO J., 3, 3143-3148.
- Suchanek, G. und Kreil, G. (1977) Translation of melittin mRNA *in vitro* yields a product terminating with glutaminylglycine rather than with glutaminamid.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 975-978.
- Suchanek, G., Kreil, G. und Hermodson, M. A. (1978) Amino acid sequence of honeybee prepromelittin synthesized *in vitro*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 701-704.
- Tajima, S., Lauffer, L., Rath, V. L. und Walter, P. (1986) The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains.
J. Cell Biol., 103, 1167-1178.
- Talbot, J. C., Dufourcq, J. und Faucon, J. F. (1979) Conformational change and self assoziation of monomeric melittin. FEBS Lett., 102, 191-193.
- Tanford, C. (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. Science, 200, 1012-1018.

- Terwilliger, T. C. und Eisenberg, D. (1981) The structure of melittin: I. Structure determination and partial refinement. II. Interpretation of the structure. J. Biol. Chem., 257, 6016-6023.
- Tosteson, M. T. und Tosteson, D. C. (1981) The sting: Melittin forms channels in lipid bilayers. Biophys. J., 36, 109-116.
- Uy, R. und Wold, F. (1977) Posttranslational covalent modification of proteins. Science, 198, 890-896.
- Verner, K. und Schatz, G. (1987) Import of an incompletely folded precursor protein into isolated mitochondria requires an energized inner membrane, but no added ATP. EMBO J., 6, 2449-2456.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene, 19, 259-268.
- Vlasak, R., Unger-Ullmann, C., Kreil, G. und Frischauf, A.-M. (1983) Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee prepromelittin. Eur. J. Biochem., 135, 123-126.
- Von Heijne, G. (1979) Transmembrane translocation of proteins. The direct transfer model. Eur. J. Biochem., 97, 175-181.
- Von Heijne, G. (1981) On the hydrophobic nature of signal sequences. Eur. J. Biochem., 116, 419-422.
- Von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal sequence cleavage sites. Eur. J. Biochem., 113, 17-21.
- Von Heijne, G. (1985) Ribosome-SRP-signal sequence interactions. The relay helix hypothesis. FEBS Lett., 190, 1-5.
- Von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucleic Acids Res., 14, 4683-4690.
- Vogt, V. M. (1973) Purification and further properties of single strand specific nuclease from *Aspergillus oryzae*. Eur. J. Biochem., 33, 192-199.
- Walter, P. (1987) Two receptors act sequentially. Nature, 328, 763-764.
- Walter, P. und Blobel, G. (1980) Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7112-7116.
- Walter, P. und Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III: Signal recognition particle (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. J. Cell Biol., 91, 557-561.

- Walter, P. und Blobel, G. (1982) SRP contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. Nature, 299, 691-698.
- Walter, P., Gilmore, R. und Blobel, G. (1984) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. Cell, 38, 5-8.
- Wartell, R. M. und Reznikoff, W. S. (1980) Cloning DNA restriction endonuclease fragments with protruding, single-stranded ends. Gene, 9, 307-314.
- Waters, M. G. und Blobel, G. (1986) Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur post-translationally and requires ATP hydrolysis. J. Cell Biol., 102, 1543-1550.
- Waters, M. G., Chirico, W. J. und Blobel, G. (1986) Protein translocation across yeast microsomal membrane is stimulated by a soluble factor. J. Cell Biol., 103, 2629-2636.
- Watts, C., Wickner, W. und Zimmermann, R. (1983) M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2809-2813.
- Werner-Washburne, M., Stone, D. E. und Craig, E. A. (1987) Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., 7, 2568-2577.
- Wickner, W. (1979a) The assembly of proteins into biological membranes: The membrane trigger hypothesis. Ann. Rev. Biochem., 48, 23-45.
- Wickner, W. (1979b) Assembly of proteins into membranes. Science, 210, 861-868.
- Wickner, W. (1983) M13 coat protein as a model of membrane assembly. Trends. Biochem. Sci., 8, 90-92.
- Wickner, W. und Lodish, H. F. (1985) Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. Science, 230, 400-407.
- Wiech, H., Sagstetter, M., Müller, G. und Zimmermann, R. (1987) The ATP requiring step in assembly of M13 procoat protein into microsomes is related to preservation of transport competence of the precursor protein. EMBO J., 6, 1011-1016.
- Wiedmann, M., Kurzchalia, T. V., Bielka, H. und Rapoport, T. A. (1987a) Direct probing of the interaction between the signal sequence of nascent preprolactin and the signal recognition particle by specific cross-linking. J. Cell Biol., 104, 201-208.
- Wiedmann, M., Kurzchalia, T. V., Hartmann, E. und Rapoport, T. A. (1987b) A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. Nature, 328, 830-833.

- Wolfe, P. B., Rice, M. und Wickner, W. (1985) Effects of two sec genes on protein assembly into the plasmic membrane of *E. coli*. J. Biol. Chem., 260, 1836-1841.
- Yamane, K., Ichihara, S. und Mizushima, S. (1987) *In vitro* translocation of protein across *Escherichia coli* membrane vesicles requires both the proton motive force and ATP. J. Biol. Chem., 262, 2358-2362.
- Yost, C. S., Hedgpeth, J. und Lingappa, V. R. (1983) A stop transfer sequence confers predictable transmembrane orientation to a previously secreted protein in cell-free systems. Cell, 34, 759-766.
- Yuan, P.-M., Pande, H., Clark, B. R. und Shively, J. E. (1982) Microsequence analysis of peptides and proteins. I. Preparation of samples by reverse phase liquid chromatography. Anal. Biochem., 120, 289-301.
- Zagursky, R. J. und Berman, M. L. (1984) Gene, 27, 183-191.
- Zerial, M., Melancon, P., Schneider, C. and Garoff, H. (1986) The transmembrane segment of the human transferrin receptor functions as a signal peptide. EMBO J., 5, 1543-1550.
- Zimmerman, S. B. und Pfeiffer, B. H. (1983) Macromolecular crowding allows blunt-end ligation by DNA ligases from rat liver or *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5852-5856.
- Zimmermann, R., Hennig, B. und Neupert, W. (1981) Different transport pathways of individual precursor proteins in mitochondria. Eur. Biochem. J., 11, 455-460.
- Zimmermann, R. und Meyer, D. I. (1986) 1986: A year of new insights into how proteins cross membranes. Trends Biochem. Sci., 11, 512-515.
- Zimmermann, R. und Mollay, C. (1986) Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum. Requirements for membrane insertion, processing and sequestration. J. Biol. Chem., 261, 12889-12895.
- Zimmermann, R. und Neupert, W. (1980a) Transport of proteins into mitochondria: posttranslational transfer of ADP/ATP carrier into mitochondria *in vitro*. Eur. J. Biochem., 109, 217-229.
- Zimmermann, R. und Neupert, W. (1980b) Biogenesis of glyoxysomes. Synthesis and Intracellular transfer of isocitrate lyase. Eur. J. Biochem., 112, 225-233.
- Zimmermann, R., Paluch, U., Sprinzl, M. und Neupert, W. (1979) Cell-free synthesis of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein of *Neurospora crassa*. Eur. J. Biochem., 99, 247-252.
- Zwizinski, C., Schleyer, M. und Neupert, W. (1984) Proteinaceous receptors for the import of mitochondrial precursor proteins. J. Biol. Chem., 259, 7850-7856.

Zwizinski, C. und Wickner, W. (1980) Purification and
characterization of leader (signal) peptidase from *E.coli* .
J. Biol. Chem., 255, 7973-7977.

7. ABKÜRZUNGEN

AMPCP	Adenosin 5', (β , γ methylen)-triphosphat
AMPNP	Adenosin 5', (β , γ imido)-triphosphat
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	Impulse pro minute
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HPLC	High performance liquid chromatography
kD	kilo-Dalton
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

LB	Luria broth
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglycol
Prot K	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
RNS	Ribonukleinsäure
S	Svedberg-Einheiten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRP	Signal recognition particle
ss	einzelsträngig
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
TEMED	N',N',N',N'-tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TLCK	Tosyllysylchloromethylketon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
TTP	Thymidintriphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat

8. DANKSAGUNG

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Richard Zimmermann bedanken. Er überließ mir das interessante Thema, gab viele entscheidende Denkanstöße und vermittelte viele experimentelle Prinzipien. Dabei war er stets zu fruchtbaren Diskussionen bereit, gewährte mir Freiheit und zeigte, trotz seines motivierenden Interesses am Fortgang dieser Arbeit, stets Geduld und Verständnis.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Bandlow, der mir die Durchführung der Dissertation am Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ermöglichte und stets am Fortschritt dieser Arbeit interessiert war.

Herrn Prof. Dr. Dr. W. Neupert danke ich für zahlreiche Anregungen und die stets gewährte Unterstützung.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben Birgitta Kaßeckert und Maria Sagstetter wesentlich beigetragen. Ihrer tatkräftigen und aufmerksamen Unterstützung gebührt große Anerkennung.

Zu danken habe ich allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie der Universität München, die durch ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft beigetragen haben, daß diese Arbeit entstehen konnte.

Diese Dissertationsschrift ist außerdem eine schöne Erinnerung an die gute Zusammenarbeit und zahlreiche Diskussionen mit Gabriel Schlenstedt und Hans Wiech. Das angenehme Arbeitsklima und die ungezwungene Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe wußte ich besonders zu schätzen.

9. LEBENS LAUF

- 7.11.1958 Geboren in Peißenberg, Oberbayern
als Sohn des Elektroingenieurs Caspar Müller und
dessen Ehefrau Sieglinde, geb. Schreiber
- 1965-1969 Besuch der Volksschule in Peißenberg
- 1969-1978 Besuch des mat./naturw. Gymnasiums in Weilheim/Obb.
- Juni 1978 Abitur
- Nov. 1978 Beginn des Studiums der Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
- Okt. 1980 Diplom-Biologen-Vorprüfung in den Fächern
allgem. Biologie, Anthropologie und Humangenetik,
Chemie und Physik
- März 1983 Diplom-Biologen-Hauptprüfung in den Fächern
Anthropologie und Humangenetik, Genetik, Zoologie
und Biochemie
- Mai 1983-
- Mai 1984 Diplomarbeit bei Prof. Dr. W. Bandlow am Institut
für Genetik und Mikrobiologie der Universität München
"Lokalisierung eines mitochondrialen cAMP-Bindepro-
teins der Hefe Saccharomyces cerevisiae und Unter-
suchungen zu seiner Funktion"
- Juli 1984 Beginn der Arbeit zu vorliegender Dissertation bei
Priv. Doz. Dr. R. Zimmermann am Institut für physio-
logische Chemie, physikalische Biochemie und Zell-
biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
- April 1985 Forschungsaufenthalt am Biozentrum Basel
bei Prof. G. Schatz
- Sept. 1985 Teilnahme am FEBS advanced course " The Analysis of
Membrane Traffic in Vitro " am EMBL Heidelberg



